

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С. Н. ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Керимов Тимур Захирович

РАЗРАБОТКА И ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ
ВИРУСНОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ДОНОРСКИХ РОГОВИЦ
НА ЭТАПЕ КОНСЕРВАЦИИ

3.1.5. – Офтальмология

3.1.14. – Трансплантология и искусственные органы

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Борзенко Сергей Анатольевич

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Актуальные эпидемиологические данные и общая характеристика семейства герпесвирусов.....	13
1.2. Вирус простого герпеса 1 типа как причина отторжения трансплантата роговицы.....	15
1.3. Патофизиологические особенности герпесвирусной инвазии.....	20
1.4. Лабораторные методы диагностики герпесвирусных кератитов.....	25
1.5. Подходы к фармакологической защите трансплантата роговицы.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Первый этап. Получение актуальных эпидемиологических данных о распространенности вируса простого герпеса 1 типа в донорском материале глазного тканевого банка.....	38
2.2. Второй этап. Разработка оригинальной рецептуры консервационного раствора для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц в условиях глазного тканевого банка.....	42
2.3. Третий этап. Исследование влияния разработанного раствора и предлагаемой технологии на задний эпителий трупных донорских роговиц...	44
2.3.1. Изменение морфометрических характеристик клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц в ходе вирусной деконтаминации.....	44
2.3.2. Оценка жизнеспособности клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц после вирусной деконтаминации.....	46
2.3.3. Оценка функциональной активности и фенотипической характеристики клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц после вирусной деконтаминации.....	49

2.3.4. Исследование микростроения слоя клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц после вирусной деконтаминации.....	50
2.3.5. Оценка стерильности консервационного раствора после вирусной деконтаминации на бактериологическом анализаторе.....	52
2.4. Четвертый этап. Исследование противовирусной эффективности разработанного раствора и предлагаемой технологии в отношении вируса простого герпеса 1 типа.....	53
2.4.1. Определение цитотоксического действия разработанного раствора с использованием клеточной линии Vero в эксперименте <i>in vitro</i>	53
2.4.2. Оценка противовирусной активности разработанного раствора в отношении вируса простого герпеса 1 типа на примере клеточной линии Vero в эксперименте <i>in vitro</i>	55
2.5. Пятый этап. Количественное определение синтезированных эндогенных интерферонов клетками донорской роговицы.....	58
2.5.1. Получение клеточных культур кератоцитов и фибробластов.....	58
2.5.2. Иммуноцитохимический анализ использованных клеточных культур...	61
2.5.3. Иммуноферментный анализ супернатантов культуры кератоцитов и фибробластов стромы роговицы человека.....	64
2.5.4. Иммуноферментный анализ образцов консервационных растворов.....	65
2.6. Шестой этап. Применение технологии вирусной деконтаминации в эксперименте <i>ex vivo</i>	66
2.6.1. Оценка противовирусной эффективности предлагаемой технологии на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов.....	66
2.6.2. Оценка противовирусной эффективности предлагаемой технологии на трупных донорских роговицах в глазном тканевом банке.....	67
2.7. Методы статистической обработки результатов исследования.....	69
2.8. Перечень используемого лабораторного оборудования и расходных материалов.....	69

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ.....	73
3.1. Результаты эпидемиологического исследования по обнаружению вируса простого герпеса 1 типа в донорском материале глазного тканевого банка.....	73
3.2. Консервационный раствор для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц.....	76
3.3. Результаты изучения влияния разработанного раствора и предлагаемой технологии на задний эпителий трупных донорских роговиц.....	81
3.3.1. Морфометрические характеристики клеток заднего эпителия.....	81
3.3.2. Жизнеспособность клеток заднего эпителия.....	87
3.3.3. Функциональная активность и фенотипическая характеристика клеток заднего эпителия.....	88
3.3.4. Микростроение клеток заднего эпителия.....	92
3.3.5. Результаты исследования стерильности консервационного раствора после вирусной деконтаминации.....	93
3.4. Результаты оценки противовирусной эффективности разработанного раствора и предлагаемой технологии.....	94
3.4.1. Цитотоксическое действие.....	94
3.4.2. Противовирусная эффективность.....	95
3.5. Результаты определения уровней синтезированных эндогенных интерферонов клетками донорской роговицы.....	99
3.5.1. Полученные клеточные культуры кератоцитов и фибробластов.....	99
3.5.2. Результаты иммуноцитохимического анализа.....	101
3.5.3. Результаты иммуноферментного анализа супернатантов культуры кератоцитов и фибробластов стромы роговицы человека.....	106
3.5.4. Результаты иммуноферментного анализа образцов консервационных растворов.....	109

3.6. Результаты оценки противовирусной эффективности предложенной технологии при помощи полимеразной цепной реакции на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов и трупных донорских роговиц.....	111
3.6.1. Результаты оценки противовирусной эффективности предлагаемой технологии на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов.....	111
3.6.2. Результаты оценки противовирусной эффективности предлагаемой технологии на трупных донорских роговицах в глазном тканевом банке.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ.....	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ.....	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В настоящее время выделяют 8 типов вирусов герпеса, образующих семейство герпесвирусов человека (Львов Д.К., 2013). Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что более 90% лиц в возрасте старше 40 лет имеют антитела к вирусу простого герпеса 1 типа и вирусу простого герпеса 2 типа (Кишкун А.А., 2006).

По оценкам ВОЗ (2012), 67% населения планеты в возрасте до 50 лет (3,7 млрд. человек) инфицированы вирусом простого герпеса 1 типа. Отмечены значительные отличия в распространенности ВПГ-1 по регионам. Наивысшая распространенность ВПГ-1 отмечена в странах Африки (87%), наименьшая – в странах Америки (40-50%).

Социально-экономический статус человека также оказывает влияние на вероятность инфицирования ВПГ-1. Данный вирус обнаруживается у 80% лиц с низким социально-экономическим статусом и у 40-60% лиц с высоким социально-экономическим статусом (Fatahzadeh M. и соавт., 2007; Chayavichitsilp P. и соавт., 2009). В масштабном эпидемиологическом исследовании, проведенном на территории России в рамках программы ВОЗ (MONICA), на примере 1014 образцов сыворотки крови было определено, что население Республики Тыва, Республики Алтай, и города Новосибирска имеет антитела к ВПГ-1 в 99% случаев (Khryanin A. и соавт., 2011).

В офтальмологических исследованиях сообщаются данные о связи вируса простого герпеса 1 типа с патологией роговицы в 66,8% случаев, с язвенными поражениями роговицы в 55,1% случаев и со слепотой, вызванной поражением роговицы, более чем в 60% случаев (Майчук Ю.Ф. и соавт., 2003-2016). При этом до настоящего времени к офтальмологам ежегодно обращается от 300 до 500 тыс человек, больных офтальмогерпесом (Зайцева Н.С. и соавт., 1982; Казаченко М.А., 1983; Майчук Д.Ю. и соавт., 2016).

Радикальным методом лечения пациентов с герпетическими кератитами является кератопластика трупным донорским материалом (Каспаров А.А. и соавт., 1988-2017; Борзенко С.А., 2008).

Трупные донорские роговицы представляют потенциальную опасность передачи герпетической инфекции реципиенту в ходе трансплантации. Так, персистенция вируса простого герпеса 1 типа в донорской роговице способна негативно повлиять на приживление трансплантата, вплоть до развития реакции тканевого отторжения (Борзенко С.А. и соавт., 1988-2016; Biswas S. и соавт., 2000; Broniek G. и соавт., 2016).

Данная проблема усугубляется тем, что проводимая терапия после сквозной кератопластики, направленная на иммуносупрессию реакции отторжения трансплантата, активизирует процесс репликации латентных вирусных инфекций.

Фенотипическая трансформация кератоцитов роговицы человека в фибробласты под действием травматических и инфекционных факторов (ВПГ-1) приводит к изменению рецепторного состава клеток, активации системы врожденного иммунитета и выработке интерферонов 1 типа (интерферона- α и интерферона- β) (Вит В.В., 2003). Стимуляция фибробластов роговицы человека индукторами интерферона приводит к выработке собственного интерферона 1 типа, оказывающего противовирусное действие (Ebihara N. и соавт., 2007).

В связи с этим для стимуляции иммунных процессов в трансплантате роговицы необходимо разработать консервационный раствор, оказывающий интерферогенное и противовирусное действие.

В настоящее время в литературе не описаны способы эффективной предтрансплантационной вирусной деконтаминации донорских роговиц, что является актуальной проблемой, определившей выбор цели данного исследования.

Цель настоящего исследования

Разработка технологии предоперационной вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц на этапе консервации в условиях глазного тканевого банка.

Задачи исследования

1. На основании результатов полимеразной цепной реакции провести анализ контаминированности трупных донорских роговиц, поступающих в глазной тканевой банк, вирусом простого герпеса 1 типа.
2. На основании анализа стандартных культуральных сред разработать консервационный раствор с противовирусной активностью для нормотермической консервации донорских роговиц, стимулирующий выработку эндогенного интерферона- β .
3. В эксперименте *in vitro* оценить влияние разработанного раствора и предлагаемой технологии на эндотелиальные клетки трупных донорских роговиц в условиях глазного тканевого банка.
4. На основании результатов вирусологических методов исследования определить противовирусную эффективность разработанного консервационного раствора в отношении вируса простого герпеса 1 типа.
5. В эксперименте *in vitro* изучить способность клеточных культур кератоцитов, фибробластов, а также ткани роговицы к продукции собственного интерферона- β при стимуляции индуктором интерферона.
6. На основании результатов полимеразной цепной реакции оценить противовирусную эффективность предложенного консервационного раствора в модельном эксперименте *ex vivo* на полученном клиническом материале и, затем, на донорском материале глазного тканевого банка.

Научная новизна

1. Впервые проведен анализ контаминированности трупных донорских роговиц вирусом простого герпеса 1 типа на донорском материале Глазного тканевого банка.

2. Впервые предложен и разработан раствор для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц на этапе консервации.
3. Впервые предложена и разработана технология вирусной деконтаминации донорских роговиц, позволяющая проводить эффективную предоперационную профилактику передачи герпесвирусной инфекции от донора к реципиенту.
4. Впервые определена противовирусная эффективность раствора для вирусной деконтаминации в эксперименте *in vitro* с использованием клеток Vero.
5. Впервые дана количественная оценка уровням секреции эндогенных интерферонов клеточными культурами кератоцитов и фибробластов роговицы, а также тканью роговицы после стимуляции индуктором интерферона.
6. Впервые с помощью полимеразной цепной реакции на трупных донорских роговицах и патологически измененных роговичных дисках реципиентов определена противовирусная эффективность предложенной технологии.

Практическая значимость результатов исследования

1. Разработанная в данном исследовании технология вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц на этапе консервации обеспечит эффективную профилактику передачи герпесвирусной инфекции от донора к реципиенту в ходе кератопластики, в том числе высокого риска.
2. Разработанный способ консервации роговиц позволит в раннем послеоперационном периоде защитить трансплантат от воздействия факторов инфекционной природы.
3. Систематизация абсолютных и относительных показаний к применению предложенной технологии в дальнейшем позволит улучшить качество ведения пациентов после трансплантации роговиц и осуществлять эффективную профилактику послеоперационных реакций отторжения трансплантата роговицы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная технология вирусной деконтаминации донорских роговиц на этапе консервации, заключающаяся в создании противовирусных условий консервации, позволяет проводить эффективную элиминацию вируса простого герпеса 1 типа из трупных донорских роговиц в глазном тканевом банке во время органного культивирования в разработанном консервационном растворе с противовирусной активностью и способностью активировать механизмы врожденного иммунитета, что при дальнейшем изучении позволит проводить эффективную профилактику передачи вируса простого герпеса 1 типа от донора к реципиенту через трансплантат в ходе кератопластики, а также защитит трансплантат от воздействия факторов инфекционной природы в раннем послеоперационном периоде.
2. Разработанная технология вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц и предложенный консервационный раствор не оказывают статистически значимого влияния на морфофункциональные характеристики и жизнеспособность клеток заднего эпителия (эндотелия) трупных донорских роговиц по сравнению с базисной технологией консервации и раствором для хранения роговицы. При этом разработанный консервационный раствор для вирусной деконтаминации обладает выраженным противовирусным эффектом в отношении вируса простого герпеса 1 типа по сравнению с базисным раствором для хранения роговицы и культуральной клеточной средой DMEM, а также стимулирует кератоциты, фибробласты и трупные донорские роговицы синтезировать эндогенный интерферон- α и интерферон- β , которые оказывают выраженное противовирусное действие, блокируя создание вирусных белков и репродукцию вируса простого герпеса 1 типа.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены в рамках XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза»

им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва, 27 июня 2019 г.), на научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва, 13 сентября 2019 г.), в ходе IV Российского национального конгресса с международным участием «Трансплантация и донорство органов» ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В. И. Шумакова» Минздрава России (г. Москва, 8 октября 2019 г.), на XII Съезде Общества офтальмологов России ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва, 1 декабря 2020 г.).

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в работу головной организации и филиалов ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Результаты диссертационной работы используются в лекционных курсах для клинических ординаторов, аспирантов и курсантов Института непрерывного профессионального образования ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, а также ординаторов и аспирантов кафедры Глазных болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, 4 из которых в журналах, рецензируемых ВАК РФ. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем работы

Текст диссертации изложен на 151 странице, содержит 27 таблиц и 18 рисунков. Работа состоит из введения, 3 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты разработки технологии, а также из заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и терминов, списка литературы. Список литературы включает 204 источника, из которых 25 отечественных и 179 иностранных.

Фундаментальная часть исследования выполнялась на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва) под руководством заведующего Центром, д.м.н., профессора, академика РАЕН Сергея Анатольевича Борзенка.

Экспериментальная работа с вирусом простого герпеса 1 типа проводилась на базе Лаборатории сравнительной вирусологии с Российским центром по герпесу Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (г. Москва) под руководством ведущего научного сотрудника, к.м.н., доцента Людмилы Михайловны Алимбаровой.

Работа с донорским материалом проводилась на базе Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва) под руководством заведующей Глазным тканевым банком, к.м.н. Мадины Хетаговны Хубецовой.

Благодарю моего научного руководителя, д.м.н., профессора, академика РАЕН Сергея Анатольевича Борзенка за разностороннюю помощь на всех этапах выполнения работы.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальные эпидемиологические данные и общая характеристика семейства герпесвирусов

Согласно последним данным Всемирной Организации Здравоохранения, в мире насчитывается 36 миллионов слепых людей [46]. Двустороннее помутнение роговицы является одной из наиболее распространенных причин потери зрения, на его долю приходится 5,1% от всех случаев слепоты [160]. По результатам проведенного мета-анализа было установлено, что 3,4% слепых людей в Восточной Европе потеряли зрение по причине двустороннего помутнения роговицы [80]. В то же время известно о 23 миллионах человек во всем мире, у которых поражения роговицы привели к односторонней слепоте [150]. Известно, что около половины зарегистрированных случаев роговичной слепоты излечимы [92].

Радикальным методом лечения пациентов, потерявших зрение по причине помутнения роговицы, является сквозная кератопластика (СКП) [67]. Данное оперативное вмешательство заключается в пересадке роговицы от донора-трупа реципиенту. Сквозная кератопластика – самый распространенный вид аллогенной трансплантации [32]. По оценкам, 91% пересаженных роговиц приживляется успешно, что является одним из лучших результатов в трансплантологии [74; 194]. К сожалению, как и любое оперативное вмешательство, сквозная кератопластика связана с некоторыми рисками. Одними из самых опасных состояний для трансплантата роговицы являются инфекционные осложнения, в числе которых реактивация вируса простого герпеса 1 типа, находящегося в пересаживаемой донорской ткани.

Согласно данным отечественных исследователей, основной инфекционной причиной, приводящей к поражению роговицы у граждан Российской Федерации, являются герпесвирусы, которым также отводится роль ведущей причины роговичной слепоты: на герпетические кератиты приходится 60% роговичной слепоты и более 66% от всей патологии роговицы [16; 21]. С точки зрения

донорства описанная герпетическая инфекция остается актуальной и в кадаверных глазах.

В настоящее время известно 8 типов вирусов герпеса человека, совокупность которых образует семейство герпесвирусов (Herpesviridae) человека. Выделяют 3 подсемейства герпесвирусов человека: альфа-герпесвирусы, бета-герпесвирусы, гамма-герпесвирусы. Подсемейство альфа-герпесвирусов включает вирус простого герпеса 1 типа, вирус простого герпеса 2 типа, вирус ветряной оспы; подсемейство бета-герпесвирусов – цитомегаловирус человека, вирусы герпеса человека 6 типа (6А и 6Б), вирус герпеса человека 7 типа; подсемейство гамма-герпесвирусов – вирус Эпштейна-Барр, а также ассоциированный с саркомой Капоши герпесвирус человека 8 типа [19; 89]. Среди известных герпесвирусов человека особого внимания заслуживает вирус простого герпеса 1 типа, поскольку чаще других обнаруживается в ткани роговицы [108].

Эпидемиологические данные, сообщаемые Всемирной Организацией Здравоохранения, свидетельствуют о том, что 67% населения планеты в возрасте до 50 лет инфицированы вирусом простого герпеса 1 типа [197].

Вирусная природа герпетических поражений роговицы впервые была подтверждена немецким офтальмологом Вильгельмом Грютером в 1912 году [90]. В настоящее время известно, что вирион вируса простого герпеса 1 типа представляет собой двунитевую линейную ДНК, упакованную в плотное ядро (кор), и имеющую ряд защитных оболочек [174]. Внешней оболочкой является суперкапсид – билипидный слой, на котором располагаются вирусные гликопротеины [104]. Внутренняя оболочка представлена капсидом диаметром 125 нм, имеющим икосаэдрическую форму [149]. Капсид состоит из 161 капсомеры – структурной белковой субъединицы [117]. Капсомеры подразделяются на 150 гексонов, образующие края и грани икосаэдра, и 11 пентонов, находящихся на всех вершинах, за исключением одной, на которой расположен цилиндрический порталный белковый комплекс, через который вирусная ДНК входит или выходит из капсида. В пространстве между

суперкапсидом и капсидом располагается тегумент – аморфный белковый слой, занимающий 2/3 пространства внутри вириона [47; 48; 68; 96].

После инвазии в клетку вирус простого герпеса 1 типа начинает активно размножаться, приводя к нарушению её метаболизма и деструкции клеточной мембраны, в результате чего клетка погибает, а множество копий вируса выходят наружу. При ослабленных иммунных механизмах созданные вирионы распространяются в соседние клетки, попадают в кровь и регионарные лимфоузлы, происходит диссеминация вируса во все органы и ткани [24; 69; 189].

1.2. Вирус простого герпеса 1 типа как причина отторжения трансплантата роговицы

Известно, что вирус простого герпеса 1 типа способен поражать все основные отделы глазного яблока: веки, конъюнктиву, роговицу, сетчатку и хориоидею [165]. Поражение роговицы вирусом простого герпеса 1 типа приводит к развитию кератита, который, в зависимости от локализации и тяжести процесса, классифицируется на эпителиальный, стромальный и некротизирующий [166; 190]. Патогномичный признак кератита герпесвирусной этиологии – роговичный синдром с изменением чувствительности роговицы и наличием в ней везикул, склонных к слиянию по ходу нервных сплетений в узоры, напоминающие веточку дерева [5]. В настоящее время для лечения поражений роговицы герпетической этиологии применяют консервативную терапию [91]. В случае неэффективности данного лечения, а также при формировании стойкого помутнения, бельма роговицы, прибегают к трансплантации роговицы [31; 36; 172].

Кератопластика трупным донорским материалом остается единственным радикальным методом лечения стойких помутнений роговицы герпесвирусной этиологии [28; 169; 173].

Первую успешную операцию по трансплантации роговицы провел офтальмолог Эдуард Зирм в 1905 году [141]. По его мнению, на результаты приживления донорской роговицы влияют правила асептики, количество грубых

механических воздействий на трансплантат в ходе операции и техника наложения швов [34]. Знаменитый ученый-офтальмолог Владимир Петрович Филатов, открывший миру возможность пересадки консервированных трупных донорских роговиц, значительное внимание уделял инфекционному контролю доноров [79].

Данные труды легли в основу современной трансплантологии. Развитие инфекционного контроля способствовало определению роли скрытых инфекций в общей трансплантологии [23].

В настоящий момент известно, что основным инфекционным агентом, поражающим роговицу, является вирус простого герпеса 1 типа [20]. Профессор Аркадий Александрович Каспаров, разработавший новые подходы к лечению офтальмогерпеса, считал роговицу: «любимым местом локализации ВПГ» [15].

В ходе множества исследований была подтверждена способность вируса простого герпеса 1 типа находиться в роговице в виде латентной формы, которая позволяет длительно существовать внутри клетки-хозяина без репликации или сборки вирионов [52; 112; 114]. В 1991 году было установлено, что латентная форма ВПГ-1 в роговице человека сохраняет способность к реактивации, репликации, активации иммунной системы независимо от ганглиозной реактивации [65].

Основными факторами, приводящими к реактивации ВПГ-1 *in vivo*, на сегодня считаются: физический / психоэмоциональный стресс, чрезмерное переутомление, переохлаждение / перегрев, чрезмерная инсоляция, травмы, хирургические вмешательства, одонтогенная инфекция, применение иммуносупрессивных препаратов, эндокринные нарушения, а также комбинации данных факторов [15; 88; 175].

Значительному прорыву в изучении персистенции ВПГ-1 в роговице способствовало открытие полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фундаментальные открытия, совершенные в 90-х годах XX века с использованием ПЦР, установили способность герпесвирусов оказывать негативное влияние на результат сквозной кератопластики. Так, в 1994 году группа ученых во главе с G. Cleator сообщила о способности вируса простого

герпеса 1 типа передаваться через донорский трансплантат и приводить к его отторжению [61]. В 1995 году J. Garweg и соавт. проводили оценку патологически измененных роговичных дисков реципиентов [82]. В результате проведенного анализа было обнаружено, что у 5 из 6 реципиентов, в роговичной ткани которых был обнаружен ВПГ-1, развился эпизод герпетического кератита в послеоперационном периоде.

Развивающийся в конце XX века интерес к проблеме определения роли ВПГ-1 в приживлении донорской роговицы побуждал ученых проводить масштабные статистические исследования. Так, в 1997 году L. Remeijer и соавт. провели ретроспективный анализ результатов 2398 трансплантаций роговицы [159]. Было установлено, что в данной группе пациентов герпетический кератит возникал в 14,2 раза чаще по сравнению с частотой встречаемости в популяции. Ученые пришли к выводу о возможности формирования герпетического кератита в послеоперационном периоде даже у пациентов без предшествующих герпесвирусных заболеваний в анамнезе. Было установлено, что сквозная кератопластика провоцирует реактивацию латентного вируса простого герпеса 1 типа. Также в 1997 году было проведено исследование G.C. Cockerham и соавт., в котором учеными оценивались причины трех случаев первичной несостоятельности трансплантата после пересадки роговицы [62]. По результатам проведенного ПЦР-исследования, ученые получили согласующиеся с данными G. Cleator выводы о возможности вируса простого герпеса 1 типа вызывать раннее отторжение трансплантата [61]. В 1998 году группа исследователей во главе с L.M. Holbach охарактеризовала вирус простого герпеса 1 типа как этиологическую причину отторжения трансплантата роговицы у пациента с герпетическими кератитами в анамнезе [98]. По мнению авторов работы, активная герпетическая инфекция в эндотелии пересаженного трансплантата роговицы приводит к эпизоду отторжения в раннем послеоперационном периоде. В 1999 году группой ученых во главе с M.V. Neufeld описан случай кератита донорской роговицы, хранящейся при 4 °C в среде для консервации Optisol GS в глазном тканевом банке [146]. По результатам проведенного исследования при помощи

ПЦР и культурального метода с использованием клеточной линии Vero в ткани трупной донорской роговицы был верифицирован вирус простого герпеса 1 типа. Авторы исследования считают, что данный случай является наглядной демонстрацией того, что ВПГ-1 сохраняет жизнеспособность при гипотермической консервации. В 2000 году S. Biswas и соавт. проводили поиск причин появления стойких эпителиальных дефектов на одном пересаженном трансплантате роговицы и развития реакции отторжения у другого реципиента [44]. После проведенного ПЦР-исследования, а также иммуногистохимического анализа (ИГХ) было установлено, что этиологической причиной данных патологических реакций явился вирус простого герпеса 1 типа. Авторы исследования утверждают, что ВПГ-1 способен вызывать не только реакцию отторжения и язвенные кератиты трансплантата роговицы в послеоперационном периоде, но и инициировать деструкцию эндотелия в органной культуре.

К началу XXI века было установлено, что вирус простого герпеса 1 типа может сохраняться в трансплантате роговицы в виде латентной формы и реактивироваться под воздействием определенных факторов в послеоперационном периоде, приводя к отторжению трансплантата. Однако было необходимо проследить передачу ВПГ-1 через донорский трансплантат, принимая во внимание штамм вируса. В связи с этим группа исследователей во главе с L. Remeijer в 2001 году опубликовали результаты своих наблюдений в издании Lancet [158]. Ученым удалось задокументировать передачу ВПГ-1 от донора к реципиенту через трансплантат в ходе пересадки роговицы с последующей реактивацией латентного вируса в послеоперационном периоде и отторжением трансплантата. Исследование было проведено путем генотипирования штаммов вируса простого герпеса 1 типа, имеющих у донора и у реципиента, в ходе ПЦР-анализа отличий в структуре ДНК. Было обнаружено полное совпадение нуклеотидной последовательности штамма ВПГ-1 в донорской ткани и организме реципиента после трансплантации. По мнению авторов исследования, передача ВПГ-1 серонегативному реципиенту создает значительную опасность отторжения трансплантата роговицы, особенно в условиях иммуносупрессивной терапии.

Сообщается, что доля контаминированных ВПГ-1 роговиц глазного тканевого банка составляет 10,5% по данным ПЦР-исследования [113]. В 2001 году R. De Kesel и соавт. провели ПЦР анализ четырех удаленных несостоятельных трансплантатов [70]. В трех из четырех трансплантатах был обнаружен вирус простого герпеса 1 типа. Авторы исследования пришли к выводу о возможности ВПГ-1 выступать в роли причины ранней несостоятельности трансплантата после пересадки роговицы. В дальнейшем появлялось все больше работ различных ученых по всему миру, которые также приходили к выводу о возможности вируса простого герпеса 1 типа выступать в роли инфекционного агента, способного передаваться от донора к реципиенту через донорскую роговицу и/или вызывать отторжение трансплантата в послеоперационном периоде [38; 45; 50; 83; 84; 120; 161; 162; 163; 185; 203].

На сегодня известно, что вирус простого герпеса 1 типа способен инфицировать роговицу несколькими путями. Антеградный путь подразумевает прижизненную реактивацию латентного ВПГ-1 с последующим перемещением из тройничного ганглия по нервным волокнам в роговицу [118; 196]. Ретроградный путь заключается в инфицировании реципиента контаминированной роговицей донора, либо инвазией вируса из внешней среды [60; 118].

На современном этапе развития офтальмологии хирурги все чаще прибегают к послойным кератопластическим операциям [28; 66]. Послойная кератопластика позволяет получить несколько видов трансплантатов из одной донорской роговицы. В связи с популяризацией послойных кератопластик участились случаи развития отдельно эндотелиита в случае эндотелиальной кератопластики, либо отдельно стромального кератита в случае глубокой передней послойной кератопластики, этиологическим фактором которых также выступает ВПГ-1 [42; 200]. Установлено, что наличие вируса простого герпеса 1 типа в трансплантате трупной донорской роговицы приводит к более быстрой потере эндотелиальных клеток как минимум в течение одного года после эндотелиальной кератопластики [155].

На данный момент установлено, что ВПГ-1 может являться причиной различных патологических реакции трансплантата роговицы в послеоперационном периоде после любой разновидности кератопластики с использованием трупных донорских роговиц.

1.3. Патофизиологические особенности герпесвирусной инвазии

Момент инвазии вируса простого герпеса 1 типа в клетку организма-хозяина играет определяющую роль в последующем ответе врожденной иммунной системы хозяина.

За последнее десятилетие ученым открылись новые пути взаимодействия вируса с клеткой организма-хозяина. Этому предшествовало открытие гена, получившего название Toll, которое совершила профессор Христиана Нюслайн-Фольхард в 1985 году в процессе изучения фундаментальных механизмов эмбриогенеза [33]. Спустя 11 лет было обнаружено, что мутантные мушки-дрозофилы с дефицитом гена Toll были более восприимчивы к инфекциям, чем мушки-дрозофилы без данного дефекта [129]. В 1997 году исследователи из Йельского университета во главе с профессором Русланом Меджитовым, обнаружили идентичный белок, встроенный в клеточную мембрану человеческих клеток, но являющийся рецептором, который был назван Toll-подобным [138].

За детальное описание роли Toll-подобных рецепторов в активации механизмов врожденного иммунитета была присуждена Нобелевская премия 2011 года в области медицины и физиологии [135].

На современном этапе развития науки считается, что распознавание и инвазия вируса простого герпеса 1 типа определяются клеткой организма-хозяина через Toll-подобные рецепторы (TLR-рецепторы), относящиеся к семейству паттерн-распознающих рецепторов (PRR) [106; 151; 153]. Вирион ВПГ-1 содержит характерные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), которые специфически распознаются Toll-подобными рецепторами и вызывают их активацию [100; 121; 202].

Взаимодействуя с вирусными белками, TLR-рецепторы направляют сигнал на активацию следующих цитозольных адаптерных белков: белка первичного ответа миелоидной дифференцировки (MyD88) и белка, индуцирующего образование интерферона- β (TRIF). Данные адаптерные белки, в свою очередь, активируют комплекс киназ, связанных с рецептором IL-1 (интерлейкин-1) (IRAK), а также фактора 6, связанного с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF6). Активация данных комплексов запускает два отдельных каскада внутриклеточных реакций, один из которых индуцирует образование интерферонов 1 типа, второй – синтез провоспалительных цитокинов [71; 119; 187].

Известно, что для синтеза провоспалительных цитокинов IRAK и TRAF6 активируют I κ B-киназный комплекс (IKK). Затем IKK фосфорилирует киназу I κ B, в результате чего транскрипционный ядерный фактор каппа-Б (NF- κ B) транслоцируется в ядро клетки, что является сигналом для экспрессии генов, ответственных за синтез провоспалительных цитокинов [63; 179; 203].

Изучена способность IRAK и TRAF6 активировать комплекс интерферон-регуляторного фактора (IRF) и киназы IKK α , путем фосфорилирования интерферон-регуляторного фактора 3 (IRF-3) и интерферон-регуляторного фактора 7 (IRF-7) в ядре клетки, что приводит к выработке интерферонов (ИФН) 1 типа [72; 119; 198].

В то же время стимуляция белков семейства TRIF вызывает включение Tank-связывающей киназы-1 (TBK-1), что в свою очередь активирует IRF-3, фосфорилирование которого в ядре клетки приводит к экспрессии генов, ответственных за синтез ИФН 1 типа [119; 148; 152].

Существует также механизм распознавания внутриклеточной чужеродной ДНК вируса, происходящий без участия TLR-рецепторов. В таком случае обнаружение ВПГ-1 происходит за счет цитозольных ДНК-распознающих рецепторов [133]. Включение цитозольных ДНК-распознающих рецепторов вызывает экспрессию белка-стимулятора генов, ответственных за выработку интерферона (STING), и передаче сигнала от них к TBK-1, что приводит к

фосфорилированию IRF-3 в ядре клетки с последующей выработкой интерферонов 1 типа [43; 133].

Воспалительная реакция, индуцированная вирусом простого герпеса 1 типа, является ответом на его инвазию в роговицу, либо следствием его реактивации. В этом процессе значительную роль играет клеточное звено врожденного иммунитета, которое представлено плазмоцитоидными дендритными клетками (pDC), натуральными киллерами (NK-лимфоцитами), нейтрофилами и макрофагами [105; 144; 188].

Плазмоцитоидные дендритные клетки в значительной мере влияют на интенсивность элиминации ВПГ-1 из роговицы за счет привлечения в пораженную область NK-лимфоцитов путем высвобождения цитокинов [49].

Функция NK-лимфоцитов в борьбе с ВПГ-1 заключается в элиминации инфицированных клеток и косвенном ингибировании пролиферации вируса путем секреции интерферона- γ [81].

Роль нейтрофилов заключается в контроле над репликацией и распространением вируса. Дефицит нейтрофилов приводит к значительному увеличению выделения вируса [182].

Вклад макрофагов в противовирусный ответ заключается в выделении различных интерлейкинов и других факторов, ограничивающих размножение ВПГ-1, привлечении других иммунных клеток в инфекционный очаг и усилении Т-клеточного адаптивного иммунного ответа [54].

Распознавание ВПГ-1 плазмоцитоидными дендритными клетками, натуральными киллерами, нейтрофилами и макрофагами инициирует каскад биохимических реакций, в конечном итоге приводящих к включению комплекса Tank-связывающей киназы 1 (ТВК-1), либо I κ B-киназного комплекса (ИКК) [119]. Активация ТВК-1 приводит к стимуляции интерферон-регуляторного фактора-3 (IRF-3), которым запускается синтез эндогенных интерферонов. В свою очередь ИКК комплекс посредством ряда биохимических реакций приводит к перемещению ядерного фактора каппа-В (NF- κ B) в клеточное ядро, что увеличивает выработку интерлейкинов и фактора некроза опухолей (TNF). Также

клетками роговицы начинают экспрессироваться новые TLR-рецепторы, включение которых инициирует синтез интерферонов, TNF и интерлейкинов [119].

По данным проведенных экспериментальных исследований, дефицит экспрессированных TLR-рецепторов приводит к снижению синтеза эндогенных интерферонов, что в свою очередь приводит к распространению вируса простого герпеса 1 типа [119].

В результате данного вирус-индуцированного механизма воспалительной реакции в зоне вирусной инвазии концентрируются интерлейкины, которые стимулируют усиление иммунного ответа, а также локализуют инфекцию.

Также одним из последствий вторжения вируса простого герпеса 1 типа в клетки роговицы является неоваскуляризация – прорастание сосудов в аваскулярные области [39]. Известна способность ВПГ-1 вызывать нарушение баланса представленных в роговице факторов роста сосудов [93]. Под воздействием вируса происходит повышение количества фактора роста эндотелия сосудов-А (VEGF-А), но снижается уровень растворимой формы рецептора VEGF-1 (sVR-1). Транскрипция VEGF-А инициируется вирусным полипептидом ICP-4 HSV-1 в момент связывания с промоторной областью VEGF-А. Начало транскрипции VEGF-А приводит к пролиферации сосудистых эндотелиальных клеток, их миграции и образованию капиллярной трубки [93]. Согласно данному патофизиологическому механизму, в результате изменения баланса между VEGF-А и sVR-1 в ткани роговицы возникает неоваскуляризация.

Одним из последствий инфекционного или травматического воздействия на роговицу является пролиферация и дифференцировка кератоцитов стромы в фибробласты [4; 195].

Результатом данной фенотипической трансформации в первую очередь является изменение рецепторного состава клетки. Так, в работе N. Ebihara и соавт. (2007 г.) изучались кератоциты, которые были выделены из трупной донорской роговицы, хранящейся в глазном тканевом банке [75]. Полученные в ходе культивирования клеточные культуры исследовались методом проточной

цитометрии на наличие экспрессии белков TLR-3 и TLR-9. В результате проведенной работы группе ученых впервые удалось установить, что белки TLR-3 и TLR-9 экспрессируются фибробластами роговицы, в то время как в кератоцитах данные белки не обнаруживаются.

На сегодня известно, что TLR-рецепторы представляют собой трансмембранные белки 1-типа, которые локализируются в клеточной стенке, а также эндосомальных мембранах фибробластов и эпителиальных клеток. В мембране клетки локализованы TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 и TLR-10 [125; 136], в то время как в эндосомах – TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9 [101; 128; 156]. При этом TLR-3 и TLR-9 распознают внутриклеточные двуцепочечные РНК (дц-РНК) и ДНК, входящие в состав поврежденных клеток и/или вирусных частиц, в том числе ВПГ-1, и инициируют противовирусный ответ [110; 124; 191].

В работе М. Ueta и соавт. (2005 г.) исследовались эпителиальные клетки патологически измененных роговичных дисков реципиентов, которые были удалены в ходе сквозной кератопластики [186]. Полученные эпителиальные клетки культивировали и обрабатывали раствором дц-РНК (поли I:C) и спустя 6 часов оценивали экспрессию TLR-рецепторов и ИФН- β . В результате проведенной TLR-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) было установлено, что в эпителии роговицы человека представлены все TLR-рецепторы, за исключением TLR-8. При этом экспрессия TLR-3 была представлена наиболее интенсивно. В то же время учеными было обнаружено, что обработка клеток дц-РНК индуцировала экспрессию гена, ответственного за синтез ИФН- β . По мнению авторов, ИФН- β , синтезированный клетками роговицы, занимает центральное место в противовирусной эффективности врожденного локального иммунного ответа. Ученые сообщают, что не все TLR-рецепторы способны индуцировать IRF-3 и вызывать экспрессию ИФН- β , даже несмотря на их общую способность активировать NF- κ B. Считается, что TLR-3 является патогномоничным рецептором, запускающим каскад реакций, которые приводят к активации IRF-3. По мнению ученых, TLR-3 используют TRIF-зависимые пути активации противовирусного ответа, в то время как остальные

TLR используют MyD88-путь. Известно, что дефицит IRF-3 приводит к значительному увеличению репликации ВПГ-1 в клетках по причине поздней и недостаточной продукции ИФН 1 типа [139].

Описанный фундаментальный механизм клеточного ответа на внедрение вируса простого герпеса 1 типа не вызывает принципиальных разногласий у исследователей. Известны внутриклеточные механизмы и звенья врожденного иммунитета, способные эффективно противостоять вирусной инфекции. Так, определена способность Toll-подобных рецепторов в ответ на инвазию ВПГ-1 инициировать каскад последовательных биохимических внутриклеточных реакций, приводящих к синтезу интерферонов 1 типа (интерферона- α и интерферона- β) и провоспалительных цитокинов. По нашему мнению, для эффективного противодействия инвазии и распространению вируса необходимо стимулировать данные естественные внутриклеточные противовирусные системы в сочетании с ингибированием репликации вируса.

1.4. Лабораторные методы диагностики герпесвирусных кератитов

На данный момент для диагностики поражений роговицы герпесвирусной этиологии используют широкий спектр объективных лабораторных исследований, среди которых: вирусологический метод, полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммунофлуоресцентный анализ и серологическое исследование.

Вирусологический метод позволяет выделять ВПГ-1 из исследуемого образца на перевиваемых культурах клеток Vero и других клеточных линиях [37; 142]. Данный метод лабораторной диагностики герпетических кератитов считается «золотым стандартом» ввиду своей высокой специфичности [95; 113; 130]. К сожалению, обнаружение ВПГ-1 при культивировании на клеточных линиях достаточно трудоемкий и продолжительный процесс, который может занимать до 7 дней [170]. Также к его недостаткам относят невысокую чувствительность [27; 170; 183].

В настоящее время диагностика ВПГ-1 переходит от методов культивирования к методам, основанным на полимеразной цепной реакции [35; 127].

Метод ПЦР был предложен Kary Mullis в 1985 году, и в кратчайшие сроки обрел широкую популярность среди ученых, которые совершали фундаментальные открытия при помощи данного метода, способствовавшие развитию различных направлений науки [168]. Спустя 8 лет, в 1993 году, за данное изобретение К. Mullis был награжден Нобелевской премией по химии [25]. В основе метода ПЦР лежит многократное копирование (амплификация) искомой нуклеотидной последовательности для её накопления и дальнейшего распознавания.

В настоящее время ПЦР, благодаря высокой чувствительности и специфичности, способствует ранней диагностике, а также позволяет подбирать оптимальное лечение даже тяжело протекающих форм герпетических кератитов [30; 102; 134]. Также ПЦР представляет собой эффективный метод лабораторной диагностики, который можно использовать для обнаружения ВПГ-1 в исследуемом образце и постановки правильного диагноза при стромальном герпетическом кератите [132]. Метод ПЦР применяется в диагностике эпителиальных герпетических поражений роговицы [115]. Данная методика позволяет диагностировать герпесвирусные поражения роговицы при помощи анализа слезной жидкости. Так, G. Satpathy и соавт. (2011 г.) обнаружили ДНК ВПГ в 32 из 229 (13,97%) образцах слезной жидкости и в 56 из 153 (36,66%) образцах соскобов с роговиц пациентов с клинической картиной кератита, вызванного ВПГ-1. При этом для наиболее точной ПЦР диагностики герпетических кератитов рекомендовано отдавать предпочтение исследованию соскобов с роговицы, но не образцов слезы данных пациентов [170].

Полимеразную цепную реакцию рекомендуется использовать как дополнительный метод диагностики герпетического кератита, но не использовать в качестве инструмента для окончательной постановки диагноза, поскольку некоторые условия способны оказывать значительное влияние на результаты

данного метода диагностики [126]. Так, по данным V. McGilligan и соавт. (2014 г.), отрицательные результаты ПЦР диагностики при выявлении ДНК ВПГ-1 в соскобах с роговицы и мазках с конъюнктивы у пациентов с классической клинической картиной оказались достоверно связаны с приемом противовирусных препаратов [137]. Известно, что применение пациентами местных анестетиков (оксибупрокаина), в сочетании с красителем на основе флуоресцеина, может снизить эффективность ПЦР за счет нарушения протекающей химической реакции [85]. Другие красители, такие как розовый бенгальский и лиссаминовый зеленый, также ингибируют протекание ПЦР реакции [171].

Показано, что ПЦР является ценным методом диагностики кератита, вызванного вирусом простого герпеса 1 типа. При этом чувствительность при обнаружении ВПГ-1 в соскобах с роговицы составляет от 70 до 100%, а специфичность – от 67,9% до 95% и более [40; 76; 78; 111; 177; 180].

Иммунофлуоресцентный анализ – лабораторный метод, который применяется для диагностики кератитов, вызванных ВПГ-1 [51]. Данный метод основан на формировании комплекса между искомыми антигенами и специфическими антителами, которые отмечены флуоресцентными маркерами, после чего регистрируется наличие и интенсивность флуоресцентного свечения. В исследовании S. Subhan и соавт. (2004 г.) проводили сравнение данного анализа с методом ПЦР в ходе исследования роговичных соскобов на содержание в них ВПГ-1 [177]. Авторы работы обнаружили, что иммунофлуоресцентный анализ и ПЦР обладали чувствительностью в 85,7% и 100%, соответственно, а также специфичностью 85,3% и 67,9%, соответственно. В исследовании А.М. El-Aal и соавт. (2006 г.) ПЦР и иммунофлуоресцентный анализ сравнивались при диагностике соскобов с роговиц, содержащих ВПГ-1 [76]. По результатам проведенного анализа было установлено, что чувствительность иммунофлуоресцентного анализа и ПЦР составляет 70% и 80%, соответственно, в то время как специфичность – 71,4% и 64,3%, соответственно.

По мнению исследователей, для наиболее точной диагностики поражений роговицы, вызванных ВПГ-1, необходимо использовать сочетание полимеразной цепной реакции и иммунофлуоресцентного анализа [76; 177].

Серологическая диагностика является лабораторным методом исследования крови пациентов с поражениями роговицы герпетической этиологии. Данный диагностический метод базируется на обнаружении в крови иммуноглобулинов различных классов. На основании полученных данных можно сделать предположение о наличии хронической или острой герпесвирусной инфекции в организме. Известно, что уровни ВПГ-1-специфичных сывороточных антител IgG могут колебаться независимо от клинических проявлений. Даже отрицательный серологический контроль не исключает протекающую герпесвирусную инфекцию. Также было показано, что по сравнению с серологическим тестированием, ПЦР обладает в 1000-10000 раз большей чувствительностью [29; 64]. По этим причинам серологическая диагностика является дополнительным инструментом в диагностике кератита, вызванного ВПГ-1.

Современные методы лабораторной диагностики кератитов, вызванных вирусом простого герпеса 1 типа, демонстрируют высокую диагностическую эффективность и клиническую значимость при грамотном назначении и интерпретации результатов врачом-офтальмологом [154]. Первичная же диагностика всегда основывается на клинических проявлениях и заключается в биомикроскопии роговицы с помощью щелевой лампы. Кератиты, вызванные ВПГ-1, могут иметь схожие клинические признаки с акантамебными и грибковыми поражениями роговицы, что затрудняет постановку диагноза [192]. Поэтому врачебный опыт имеет принципиальное значение в постановке первичного диагноза герпетического кератита, получении биоматериала, назначении подходящих методов исследования и схемы лечения [40; 137].

1.5. Подходы к фармакологической защите трансплантата роговицы

В качестве современных лекарственных средств противовирусной терапии поражений роговицы, вызванных вирусом простого герпеса 1 типа, применяются

препараты, относящиеся к группам аномальных нуклеозидов, а также интерферонов и индукторов интерферонов [18].

Наибольшее распространение в клинической практике среди препаратов фармакологической группы аномальных нуклеозидов получил ацикловир [57]. Данный препарат является синтетическим аналогом ациклического пуринового нуклеозида, который, попадая в инфицированные клетки, фосфорилируется до ацикловиртрифосфата, встраивается в цепочку вирусной ДНК и блокирует ее синтез посредством конкурентного ингибирования вирусной ДНК-полимеразы.

Повсеместное использование ацикловира в терапии герпетических инфекций привело к возникновению устойчивых к воздействию противовирусных препаратов штаммов ВПГ-1. Такие ацикловир-устойчивые штаммы ВПГ-1 способны вызывать тяжело протекающие кератиты [58] и некротизирующие кератиты [184]. Выделяют три механизма, приводящие к развитию резистентности: потеря активности тимидинкиназы, перестройка тимидинкиназной активности или субстратной специфичности, изменение активности ДНК-полимеразы [201].

В связи с этим для лечения поражений роговицы, вызванных ВПГ-1, рекомендуется также использовать аналоги ацикловира, например, валацикловир, фамцикловир, ганцикловир, обладающих большей биодоступностью, меньшими побочными эффектами [40; 109] и, как правило, требующих назначения меньших дозировок для получения терапевтического эффекта [118]. При этом известно, что противовирусная эффективность ацикловира и ганцикловира в лечении инфекций, вызванных ВПГ-1 как минимум сопоставима [116]. Однако, по некоторым данным, полученным в ходе анализа 28 исследований с участием 2062 глаз, было показано умеренное преимущество ганцикловира в скорости заживления роговичного дефекта при местном применении [57].

Ожидалось, что в связи со схожей с ацикловиром химической структурой и механизмом действия ганцикловир столкнется с вирусной перекрестной устойчивостью. Однако, штаммы ВПГ-1, устойчивые к ганцикловиру, на данный момент встречаются не часто, примерно в 0,1-0,7% случаев среди здоровых лиц

[59]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе активности ганцикловира, препятствуют быстрому развитию вирусной резистентности.

При исследовании пациентов с кератитом, вызванным ВПГ-1, в 14% случаев ($n = 16$) наблюдался клинически устойчивый к ацикловиру штамм вируса, что подтверждалось результатами полимеразной цепной реакции [97]. Все пациенты с ацикловир-устойчивой формой кератита впоследствии были успешно вылечены местными инстилляциями ганцикловира [97].

В 2011 г. J. Goodfellow и соавт. изучали влияние профилактического применения аномальных нуклеозидов на выживаемость трансплантата у 403 пациентов, перенесших пересадку роговицы по поводу герпесвирусного кератита. По полученным данным, 5-летняя выживаемость трансплантата роговицы в группе пациентов, профилактически принимающих пероральные формы аномальных нуклеозидов, составила 75%, в то время как в группе реципиентов, не принимающих противовирусные препараты – 70%. Авторы исследования считают, что профилактическое применение пероральных форм аномальных нуклеозидов способствует лучшей выживаемости трансплантата роговицы [87].

Лечение и профилактика поражений роговицы герпесвирусной этиологии при помощи аномальных нуклеозидов заключается в воздействии на этап репродукции вируса внутри клетки за счет интеграции в процесс синтеза вирусной ДНК, формировании дефектного генома и, следовательно, неинфекционного вируса.

Существуют альтернативные естественные биологические клеточные механизмы, также позволяющие проводить эффективную вирусную деконтаминацию. Так, известно, что препараты интерферона и индукторов интерферона перестраивают внутриклеточный метаболизм таким образом, что репродукция ВПГ-1 становится невозможной, при этом соседние клетки также становятся невосприимчивыми к данному инфекционному агенту [17; 140].

Одними из биологических внутриклеточных веществ, способных активировать апоптоз и некроптоз клетки, приводящие к элиминации вируса простого герпеса, являются интерфероны [55; 99; 164].

Интерфероны представляют собой группу белков с противовирусными свойствами, синтезирующихся клеткой в ответ на вирусную инвазию либо при контакте с другими невирусными и синтетическими веществами, а также эндотоксинами бактерий [15; 178; 181]. Интерферон обнаружили Алик Айзекс и Жан Линдемманн в 1957 году [94].

На сегодня выделяют три типа интерферонов, классифицируемых в соответствии с рецептором, через который инициируется передача сигнала [8; 123; 131]. Интерферон (ИФН) 1 типа включает: ИФН- α ((лейкоцитарный) имеет 12–14 подтипов), ИФН- β (фибробластный), ИФН- ω , ИФН- κ , ИФН- ϵ ; Интерферон 2 типа состоит из ИФН- γ ; Интерферон 3 типа подразделяется на: ИФН- λ 1 (иммунный), ИФН- λ 2, ИФН- λ 3. Рецепторы к интерферонам 1 типа представлены во всех тканях организма, однако величина продукции варьирует в зависимости от типа клеток. Так, ИФН- β продуцируется преимущественно фибробластами и по этой причине в некоторых источниках называется фибробластным. Интерферон 2 типа продуцируется антиген-активированными Т-клетками, НК-клетками и макрофагами. Интерфероны 3 типа экспрессируются только в отдельных эпителиальных клетках, связываются с отдельным рецептором, образованным лигандсвязывающей субъединицей и сигнальной трансдуцирующей субъединицей [10; 53; 143; 145].

Механизм действия интерферонов изучен не полностью. Согласно современной теории, экспрессия интерферонов происходит в ответ на вирусную инвазию (патофизиологический механизм представлен в параграфе 1.3. данной главы). Синтезированные инфицированной клеткой интерфероны 1 типа (ИФН- α и ИФН- β) распространяются на соседние клетки, взаимодействуя с расположенными на их мембране специфическими рецепторами IFNAR (interferon- α/β receptor), состоящими из субъединиц IFNAR1 и IFNAR2, и связанными с тирозинкиназой 2 (ТΥК2) и янус-активированным киназами (JAK). Киназы ТΥК2 и JAK фосфорилируют остатки тирозина в цитоплазматических доменах IFNAR, создавая места для присоединения белков семейства преобразователей сигнала и активаторов транскрипции (STAT), для дальнейшего

присоединения к ним JAK и фосфорилирования. Фосфорилированные STAT (pSTAT) образуют гомодимеры, либо гетеродимеры и транслоцируются в клеточное ядро. Так, функция гомодимера pSTAT1 заключается в связывании с гамма-активированной последовательностью (GAS), расположенной в промоторной области интерферон-стимулированных генов (ISG), что вызывает транскрипцию данных генов. Гомодимер pSTAT3 активирует транскрипцию генов, ответственных за синтез STAT3. Фосфорилированные STAT1 и STAT2 образуют гетеродимер, который приводит к вовлечению регуляторного фактора интерферона-9 (IRF9) и образованию комплекса интерферон-стимулированного гена 3 (ISGF3), являющегося активатором транскрипции. Затем этот комплекс переносится в клеточное ядро и связывается с ИФН-стимулированными элементами ответа (ISRE) в промоторной области интерферон-стимулированных генов (ISG), что вызывает транскрипцию генов, являющихся ключевыми в процессе постройки противовирусных белков [11; 56; 86; 103; 176].

Интерферон 1 типа способен вызывать синтез множества противовирусных белков, ограничивающих репликацию вируса и останавливающих его распространение в ткани. Известными эффектами интерферона 1 типа являются:

- 1) индукция фермента 2'-5'-олигоденилатсинтетаза (OAS) – активирует латентную нуклеазу RNaseL, что вызывает деградацию вирусной ДНК;
- 2) активация РНК-зависимой протеинкиназы (PKR) – блокирует трансляцию вирусной РНК;
- 3) индукция ферментов ГТФаз – приводит к ограничению локализации вирусного нуклеокапсида;
- 4) активация интерферон-стимулированного гена 15 (ISG15) – препятствует высвобождению вирусных частиц;
- 5) стимуляция белков APOBEC3 – вызывает гипермутацию вирусной ДНК;
- 6) активация механизма апоптоза для ликвидации инфицированных вирусом клеток путем управления лигандами Fas (FasL), PDL-1 и TRAIL;
- 7) индукция синтеза протеина-А устойчивости к миксовирусам (MxA) – приводит к угнетению вирусной репликации [13; 14; 26].

Механизм действия индукторов интерферона, в том числе Циклоферона (меглумина акридоацетат) и Полудана (комплекс полиадениловой и полиуридиловой кислот) происходит по TLR-опосредованному патофизиологическому механизму, описанному в параграфе 1.3. данной главы [6]. После выработки эндогенных интерферонов 1 типа механизм действия соответствует механизму, описанному в данном параграфе.

Индукторы интерферонов имеют ряд преимуществ над препаратами интерферонов: 1) в отличие от рекомбинантных ИФН, индукторы интерферонов не обладают антигенностью; 2) продукция ИФН после применения индукторов интерферонов регулируется внутриклеточными механизмами, что предотвращает побочные эффекты препаратов интерферонов, связанные с передозировкой; 3) однократного применения индукторов интерферонов достаточно для длительной продукции терапевтического уровня эндогенного ИФН, в то время как при использовании экзогенных препаратов интерферона для этого потребуется многократное введение; 4) применение индукторов интерферона позволяет инициировать синтез эндогенного интерферона в клетках определенных популяций [7; 9].

В экспериментальном исследовании Sainz S. и соавт. (2002 г.) изучалась противогерпетическая эффективность интерферонов в сравнении с аномальным нуклеозидом ацикловиром [167]. Исследователями было установлено, что совместное применение интерферона- α , - β , - γ обладает противовирусной эффективностью, сопоставимой с аномальным нуклеозидом. Также отмечено, что раздельное добавление только ИФН- β , либо только ИФН- γ в клеточную линию Vero ингибирует репликацию вируса простого герпеса в 20 раз, в то время как совместное их использование ингибирует репликацию вируса в 1000 раз. Авторы исследования сообщают, что одновременная активация интерфероновых α -/ β -рецепторов и γ -рецепторов в ответ на инвазию ВПГ-1 значительно усиливает противовирусный ответ клетки.

Известно, что при использовании в клинической практике интерферон и индукторы интерферона ускоряют заживление кератитов, вызванных ВПГ-1. Так,

в исследовании Wilhelmus K. (2000 г.) сообщается, что комбинация инстилляций интерферона с аномальным нуклеозидом значительно ускоряет заживление роговичного эпителия [193].

В работе Barker N. и соавт. (2008 г.) проводилось сравнение эффективности топических интерферонов по сравнению с плацебо и аномальными нуклеозидами в лечении герпесвирусных поражений роговицы. Авторы установили, что применение местных форм интерферонов (ИФН- α , ИФН- β) значительно ускоряет заживление роговичных дефектов через 7 и 14 дней по сравнению с плацебо. Не было обнаружено статистически значимой разницы в скорости заживления спустя 7 дней терапии местными формами интерферона- β и инстилляциями аномальных нуклеозидов. Совместное применение данных противовирусных препаратов значительно ускоряло заживление роговичных дефектов на 7-й день лечения по сравнению с монотерапией только аномальным нуклеозидом [41].

Двойное слепое клиническое исследование с участием 8 лечебных учреждений Китая посвящено сравнению эффективности интерферонов и аномальных нуклеозидов. Было установлено, что офтальмологические формы данных фармакологических препаратов обладают сопоставимой клинической эффективностью в лечении поражений роговицы, вызванных ВПГ-1. В данном отчете сообщается, что инстилляции интерферона являются эффективным противовирусным средством лечения герпесвирусных кератитов [107].

Отечественными исследователями, как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике была показана противовирусная эффективность индукторов интерферонов. Так, Ф.И. Ершов и А.А. Каспаров занимались изучением активности Циклоферона и Полудана при лечении пациентов с герпесвирусными поражениями роговицы. В результате проведенной работы было установлено, что оба препарата обладают выраженной противовирусной активностью в отношении ВПГ-1 за счет синтеза эндогенных интерферонов в терапевтических концентрациях [12].

Известно, что повышение температуры способствует значительному усилению противовирусного ответа интерферонов [73; 77]. Так, в исследовании

Lane W. и соавт. (2018 г.) сообщается о повышении противовирусной активности интерферона- α и интерферона- β в условиях гипертермии [122]. По мнению ученых, данное наблюдение может объяснить появление фебрильной реакции организма во время вирусной инфекции.

Обязательным звеном фармакологической защиты трансплантата роговицы в послеоперационном периоде является применение глюкокортикостероидной иммуносупрессивной терапии [147]. При этом ВПГ-1 считается оппортунистической инфекцией, активирующейся в условиях сниженного иммунитета [24]. Известно, что глюкокортикостероидная терапия может вызывать активацию даже латентного ВПГ-1 [162; 204] и приводить к отторжению трансплантата в случае назначения при активной герпетической инфекции роговицы [84]. Также у пациентов, которые применяют инстилляцию глюкокортикостероидов, может наблюдаться перекрестная резистентность ВПГ-1 к ацикловиру и ганцикловиру [59; 199].

Таким образом, все вышеизложенное свидетельствует о том, что сегодня существует множество различных методов предоперационной диагностики, изучены основные патофизиологические пути герпесвирусной инвазии и разработаны подходы к фармакологической терапии поражений роговицы, вызванных ВПГ-1. При этом в последние годы появились новые разновидности кератопластических операций, происходит популяризация трансплантации роговицы и, как следствие, растет число сообщений об отторжении пересаженного донорского материала по причине герпесвирусной контаминации. Однако технологии диагностики предтрансплантационной контаминации донорских роговиц ВПГ-1 и способы его деконтаминации на этапе консервации донорского материала не описаны в литературе, что представляет несомненную актуальность, как для клинической офтальмологии, так и для фундаментальной медицины.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование подразделяется на шесть этапов, соответствующих поставленным задачам.

На первом этапе проводилось определение доли контаминированных ВПГ-1 трупных донорских роговиц на материале крупнейшего в России Глазного тканевого банка. Получение эпидемиологических данных было необходимо, поскольку население г. Москвы имеет уникальный социально-экономический состав, что находит свое отражение в особенностях контаминации донорского материала.

На втором этапе с учетом изученных эпидемиологических особенностей была предложена уникальная рецептура отечественного консервационного раствора для вирусной деконтаминации, обладающего противовирусными свойствами в отношении ВПГ-1.

Третий этап исследования был посвящен разносторонней оценке влияния разработанного раствора и предлагаемой технологии консервации на клетки заднего эпителия трупных донорских роговиц в сравнении с консервацией по базисной технологии.

Четвертый этап заключался в изучении противовирусных свойств разработанного раствора для вирусной деконтаминации при сравнении с базисным раствором для консервации роговицы.

На пятом этапе работы изучалась способность предложенного раствора активировать естественные биологические внутриклеточные механизмы врожденного иммунитета.

В ходе шестого этапа исследования проводилась оценка противовирусной эффективности предлагаемой технологии в эксперименте *ex vivo* вначале на патологически измененных роговичных дисках реципиентов, затем на трупных донорских роговицах, полученных из Глазного тканевого банка.

Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из трупных человеческих глаз, проводились в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства Российской Федерации.

Глазной тканевой банк ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России получает трупные человеческие глаза из танатологических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента Здравоохранения города Москвы на основании лицензии Федеральной государственной службы по надзору за Здравоохранением № 99-01-005317 от 30.04.2008 г. и № ФС-99-01-008251 от 18.02.2013 г. Лицензия позволяет использовать ткани, выделенные из трупных человеческих глаз, для целей трансплантации и научных исследований.

Выкраиванию роговично-склеральных дисков предшествовала серологическая диагностика образцов сыворотки доноров-трупов на предмет контаминации ВИЧ, гепатитами В и С, сифилисом, как опасных для жизни инфекций.

2.1. Первый этап. Получение актуальных эпидемиологических данных о распространенности вируса простого герпеса 1 типа в донорском материале глазного тканевого банка

Отсутствие данных о распространенности вируса простого герпеса 1 типа в донорском материале глазных тканевых банков России потребовало проведения эпидемиологического исследования.

Для проведения данного этапа исследования из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России были получены 32 глаза от 16 доноров-трупов.

Исследование на тканях, выделенных из трупных глаз, проводилось в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства Российской Федерации.

Отбор роговиц осуществлялся на основании классификации трансплантабельности – морфофункциональной оценки, которая включает биомикроскопическую характеристику и адреналиновую скрининг-пробу, предложенные С.А. Борзенком [2]. К исследованию были допущены роговицы с показателями 1А, 1В, 1С (нетрансплантабельные роговицы) по классификации трансплантабельности. Характеристика использованного донорского материала представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика использованного донорского материала

Количество роговиц	32
Соотношение женщин и мужчин	7/9
Средний возраст, лет	54 (\pm 3)
Среднее время от момента смерти до ввода в эксперимент, ч	18 (\pm 2)

На данном этапе исследования трупные донорские роговицы (роговично-склеральные диски) выкраивались в операционной Глазного тканевого банка в соответствии с «Алгоритмом заготовки трупных роговиц человека для трансплантации» [1]. Полученные роговицы ($n = 32$) помещались в стерильные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл с транспортным раствором (1000 мкл), после чего пробирки нумеровались, укупоривались и направлялись на исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1).

Оценка присутствия ДНК вируса простого герпеса 1 типа в заготовленных роговицах ($n = 32$) проводилась методом полимеразной цепной реакции в Клинико-диагностической лаборатории ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и в Лаборатории молекулярной биологии компании «Диаэм» (г. Москва).

Для выделения ДНК использовались фрагменты роговицы массой от 80 до 100 мг. Образцы гомогенизировали с помощью диспергатора HG-15A-Set (Daihan Scientific Co., Республика Корея). Выделение геномной ДНК из гомогената проводили с помощью набора DiaGene для выделения ДНК из тканей (Диаэм, Россия) по методике производителя. Объем элюата составлял 50 мкл. Качество выделенной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США), количество выделенной ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и коммерческого набора Qubit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкциям производителя.

Дополнительно проводился анализ целостности геномной ДНК методом капиллярного электрофореза с помощью системы фрагментного анализа BioAnalyzer 2100 и набора Agilent DNA 12000 (Agilent Inc., США). Выделенная ДНК использовалась для обнаружения ВПГ-1 методом ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами.

Затем проводился анализ выделенной ДНК методом количественной ПЦР с флуоресцентными зондами с целью выявления ВПГ-1. Геном-мишенью ВПГ-1 выступал ген UL42 (вирусная ДНК-полимераза), специфичный для ВПГ-1. Зонд к гену UL42 был помечен HEX. В качестве количественного стандарта ДНК ВПГ-1 использовалась плазида, содержащая фрагмент вирусной ДНК. Этот фрагмент был амплифицирован с помощью праймеров, последовательности которых приведены в таблице 3, и набора Phusion High-Fidelity PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, США). После очистки ПЦР-фрагмент клонировали в плазмиду pCR-TOPO (Thermo Fisher Scientific, США). Полученная плазида pCR-HSV-1 использовалась в качестве стандарта при количественной ПЦР в реальном времени. Контроль ПЦР осуществлялся путем амплификации фрагмента человеческого гена HMBS (гидроксиметилбилан-синтаза), флуоресцентный зонд к этому фрагменту был помечен FAM. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 2 нг геномной ДНК, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймера, специфичных к человеческому гену HMBS или вирусному гену UL42, 0,2 мкМ соответствующего флуоресцентного зонда и 10 мкл мастер-микса для ПЦР Biolabmix HS-qPCR (Биолабмикс, Россия).

Каждая точка ставилась в двух повторах. ПЦР проводилась на амплификаторе CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories Inc., США) при следующих условиях: начальная денатурация при 95 °C в течение 1 мин, затем 50 циклов, включающих денатурацию при 95 °C (10 секунд) и отжиг/элонгацию с детекцией флуоресценции при 60 °C (30 секунд). В качестве контроля использовался препарат геномной ДНК TaqMan Control Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Нуклеотидные последовательности использованных праймеров и флуоресцентного зонда представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности использованных праймеров и флуоресцентного зонда (HMBS-forward – прямой праймер, HMBS-reverse – обратный праймер, HMBS-probe – флуоресцентный зонд)

Название гена	Нуклеотидные последовательности с флуоресцентным зондом	
HMBS	HMBS-forward	5'-CCATCTGCAAACGGGAAAACC-3'
	HMBS-reverse	5'-TGAGGGAACTTTCTCTGTAGCTG-3'
	HMBS-probe	5'-FAM-CCCCACGGCACTTTTCTCTGGCAAG-BHQ1-3'

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности использованных праймеров и флуоресцентного зонда (HMBS-forward – прямой праймер, HMBS-reverse – обратный праймер, HMBS-probe – флуоресцентный зонд)

Название гена	Нуклеотидные последовательности с флуоресцентным зондом	
UL42	UL42-forward	5'-GCCAGCGAGACGCTGAT-3'
	UL42-reverse	5'-ACGCAGGTACTCGTGGTGA-3'
	UL42-probe	5'-HEX-CGCGAACTGACGAGCTTTGTGGT-BHQ1-3'

Положительным результатом считалось превышение флуоресценцией по каналу HEX порогового значения (выставлялось автоматически) до 40 цикла, что соответствовало обнаружению ДНК вируса простого герпеса 1 типа. Результаты ПЦР-анализа представлены в разделе 3.1. главы 3.

2.2. Второй этап. Разработка оригинальной рецептуры консервационного раствора для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц в условиях глазного тканевого банка

Разработка раствора для вирусной деконтаминации на этапе консервации проводилась на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

В процессе разработки раствора для вирусной деконтаминации были сформулированы основные требования к его свойствам: раствор данного назначения должен обладать консервационными, противовирусными и иммуномодулирующими свойствами.

Консервационный эффект созданного раствора должен обеспечиваться базисной консервационной средой. В качестве ближайшего аналога была использована среда для консервации донорских роговиц, предложенная С.Н. Федоровым, З.И. Мороз, С.А. Борзенком, Ю.А. Комахом (патент РФ № 93010287). Данная среда является единственной отечественной средой, приближенной по аминокислотному составу к водянистой влаге, а также содержащей дополнительные компоненты, которые позволяют стабилизировать клеточные мембраны и внутриклеточные органеллы для хранения в условиях глазного тканевого банка при гипотермии (4 °С) на протяжении 6 суток. Также в состав данной среды входят антибиотики и противогрибковые препараты.

Для получения противовирусного эффекта, при сохранении консервационных свойств, требовалось оптимизировать состав и соотношение компонентов таким образом, чтобы адаптировать имеющуюся среду к органотипическому культивированию (37 °С). В связи с этим подбиралась оптимальная концентрация хондроитин-сульфата А и декстрана с учетом молекулярной массы. Учитывалась возможность кратковременной гипертермической консервации (до 38 °С). Необходимость повышения

температуры консервации до 37-38 °С обусловлена диапазоном температурной активности противовирусных звеньев врожденного иммунитета. Так, считается, что иммунные и регуляторные активности интерферонов проявляются при повышенной температуре, которая также способствует ускорению пролиферативной активности и метаболизма клеток роговицы.

Также в состав раствора вошли современные противовирусные препараты двух фармакологических групп с доказанной клинической эффективностью в отношении вируса простого герпеса 1 типа – аномальный нуклеозид (ганцикловир) и индуктор эндогенного интерферона (меглюмина акридонацетат). На этапе создания раствора противовирусная эффективность различных фармакологических препаратов и их комбинаций изучалась в вирусологических лабораториях с привлечением экспертов-вирусологов.

Иммуномодулирующий эффект созданного раствора обеспечивается входящим в его состав индуктором интерферона. Эффект данной фармакологической группы препаратов обусловлен стимуляцией выработки эндогенного интерферонов 1 типа (ИФН- α и ИФН- β) в результате стимуляции Toll-подобных рецепторов.

2.3. Третий этап. Исследование влияния разработанного раствора и предлагаемой технологии на задний эпителий трупных донорских роговиц

Принципиальное значение в поддержании гомеостаза трупных донорских роговиц в процессе консервации играет сохранение жизнеспособности заднего эпителия (эндотелия) – клеточного монослоя, лишённого митотической активности и осуществляющего насосную функцию.

В связи с этим изучалось влияние предлагаемой технологии на морфометрические характеристики, жизнеспособность, функциональную активность, фенотипическую характеристику и микростроение клеток заднего эпителия. Оценивалась стерильность предложенного консервационного раствора.

Лабораторные исследования третьего этапа проводились на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

2.3.1. Изменение морфометрических характеристик клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц в ходе вирусной деконтаминации

Для проведения данной части исследования из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России были получены 30 глаз от 15 доноров-трупов. Исследование на тканях, выделенных из трупных глаз, проводилось в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ. Одна роговица от каждого донора входила в опытную группу, парная – включалась в контрольную. Согласно классификации трансплантатбельности [1; 2], исследуемые роговицы имели показатели 2А и 2В (трансплантатбельные роговицы). Характеристика использованного донорского материала представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика использованного донорского материала

Количество роговично-склеральных дисков	30
Соотношение женщин и мужчин	14/16
Средний возраст, лет	53 (\pm 7)
Среднее время от момента смерти до ввода в эксперимент, ч	17 (\pm 4)

Проводилось выкраивание роговично-склерального диска ($D = 16$ мм) в условиях глазного тканевого банка в соответствии с «Алгоритмом заготовки трупных роговиц человека для трансплантации» [1]. Далее полученные образцы обеих групп ($n = 30$) помещали во флаконы с раствором для хранения роговицы и подвергали гипотермической консервации при 4 °С. Спустя сутки оценивались исходные морфометрические характеристики эндотелиальных клеток при помощи кератоанализатора для Глазных банков (ЕКА-98, Konan Med. Inc., Япония). Изучаемые морфометрические характеристики включали: плотность эндотелиальных клеток (ПЭК), а также их площадь и показатель гексагональности.

Затем роговицы, входящие в опытную группу, согласно предлагаемой технологии, переносились в раствор для вирусной деконтаминации, после чего помещались в термостат для нормотермической органотипической консервации при температуре 37 °С, которая активировывает синтез эндогенных интерферонов. В то же время флаконы контрольной группы хранились в гипотермических условиях, согласно технологии заготовки трупных роговиц человека для трансплантации [1; 2]. Спустя сутки оценивали морфометрические характеристики эндотелиальных клеток в обеих группах.

Далее роговично-склеральные диски опытной группы переносили в раствор для хранения роговицы и хранили при гипотермических условиях. Спустя сутки гипотермической консервации в обеих группах оценивали изменения

морфометрических характеристик эндотелиальных клеток (плотность, площадь и критерий гексагональности), после чего хранили при 4 °С до окончания эксперимента (до 6 суток). Также образцы использованных растворов для вирусной деконтаминации (n = 15) направлялись на исследование стерильности, и, дополнительно, вместе с образцами растворов для хранения роговицы контрольной группы (n = 15), подвергались иммуноферментному анализу на содержание интерферонов 1 типа. Подробное описание методик проведенных исследований консервационных растворов представлено в разделах 2.3.5. и 2.5.4. данной главы.

На 6-е сутки, после заключительной оценки морфометрических характеристик эндотелиальных клеток, роговично-склеральные диски выводили из эксперимента для исследования жизнеспособности, функциональной активности с фенотипической характеристикой и микростроения слоя эндотелиальных клеток, методики которых представлены, соответственно, в разделах 2.3.2., 2.3.3. и 2.3.4. данной главы. Результаты измерений морфометрических характеристик клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц на всех сроках наблюдения опытной и контрольной групп представлены в разделе 3.3.1. главы 3.

2.3.2. Оценка жизнеспособности клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц после вирусной деконтаминации

Исследование жизнеспособности клеточного слоя заднего эпителия роговиц опытной (n = 15) и контрольной (n = 15) групп проводилось методом иммуногистохимического анализа с использованием коммерческого набора «Live and Dead» (Abcam plc., Великобритания). Данный набор представляет собой комплекс флуоресцентных красителей, окрашивающих живые клетки в зеленый цвет (Ex. 494; Em. 515), мертвые клетки – в красный цвет (Ex. 528; Em. 617).

Оценка полученных образцов проводилась на конфокальном лазерном сканирующем биологическом микроскопе (FluoView FV10i, Olympus Corporation, Япония). Подсчет клеток на полученных изображениях осуществлялся рутинным способом.

Ввиду технических особенностей работы конфокального лазерного сканирующего биологического микроскопа было необходимо провести дополнительную процедуру, заключающуюся в выкраивании гистологического комплекса строма - Десцеметова мембрана - эндотелий, толщиной не более 200 мк из корнеосклеральных дисков обеих групп при помощи микрократома (Moria Inc., Франция).

Процедура формирования вышеуказанного гистологического комплекса проводилась по следующему алгоритму:

шаг 1 – осуществлялась сборка искусственной передней камеры глаза (MORIA Inc., Франция);

шаг 2 – в собранную искусственную переднюю камеру глаза производили подачу стерильного раствора NaCl 0,9%, одновременно укладывали корнеосклеральный диск так, чтобы задний эпителий был обращен книзу;

шаг 3 – фиксировали роговично-склеральный диск в искусственной передней камере глаза, после чего повышали давление до нормотонического, контролируя его изменение пальпаторным методом;

шаг 4 – проводили исходную пахиметрическую оценку роговично-склерального диска с использованием оптического когерентного томографа (iVue100, Optovue, США);

шаг 5 – устанавливали лезвие в микрократом и вставляли режущую головку в направляющие фиксатора на искусственной передней камере глаза;

шаг 6 – совершали скользящее движение головкой микрократома по направляющим, в результате чего формировался срез заданной толщины. В зависимости от исходной толщины роговично-склерального диска данный шаг

повторяли для достижения толщины гистологического комплекса стромы - Десцеметова мембрана - эндотелий ≤ 200 мкм;

шаг 7 – проводили итоговую пахиметрическую оценку оставшихся слоев роговично-склерального диска с использованием оптического когерентного томографа;

шаг 8 – разбирали искусственную переднюю камеру глаза, извлекали готовый роговично-склеральный диск требуемой толщины (не более 200 мкм), переносили его во флакон с раствором для хранения роговицы и направляли на иммуногистохимическое исследование.

Подготовка к иммуногистохимическому исследованию заключалась в выкраивании диска диаметром 8 мм из центральной зоны гистологического комплекса при помощи роговичного трепана Barron (Katena Products, Inc., США). Затем полученный диск разделяли на 4 равные части для изучения, соответственно, жизнеспособности, функциональной активности, фенотипической характеристики, микростроения клеток заднего эпителия в опытной и контрольной группах.

Протокол иммуногистохимического исследования состоял из стандартных этапов, включающих обработку первичными и вторично-мечеными антителами, инкубацию при комнатной температуре, согласно инструкции производителя, контрастирование клеточного ядра и последующий анализ.

Объективная оценка полученных изображений проводилась при помощи программного обеспечения «CellProfiler» (Broad Institute Inc., США). Данная компьютерная программа идентифицирует необходимые для анализа клеточные структурные элементы, такие как ядро и/или цитоплазму, после чего по встроенному исходному коду оценивает интенсивность свечения каждой клетки. Результаты измерений представлены в разделе 3.3.2. главы 3.

2.3.3. Оценка функциональной активности и фенотипической характеристики клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц после вирусной деконтаминации

Функциональная активность заднего эпителия роговиц опытной ($n = 15$) и контрольной ($n = 15$) групп изучалась в ходе иммуногистохимического исследования уровней экспрессии натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы (Na^+/K^+ -АТФазы). Данный фермент характеризует насосную (помпальную) функцию клеток заднего эпителия, являющуюся ключевой в поддержании гомеостаза роговицы.

Иммуногистохимическое исследование проводилось по вышеописанной стандартной методике, с использованием первичных антител к Na^+/K^+ -АТФазе (Abcam plc., Великобритания) и видоспецифичных вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами AlexaFluor 594 в разведении 1:250 (Abcam plc., Великобритания). Экспрессия данного фермента изучалась на конфокальном лазерном сканирующем биологическом микроскопе (FLUOVIEW FV10i, OLYMPUS Corporation, Япония). Объективный анализ полученных изображений проводили при помощи программного обеспечения «CellProfiler» (Broad Institute Inc., США). Результаты измерений представлены в разделе 3.3.3. главы 3.

Фенотипическая характеристика заднего эпителия роговиц опытной ($n = 15$) и контрольной ($n = 15$) групп изучалась в ходе иммуногистохимического исследования уровней экспрессии Zonula occludens-1 (ZO-1). Маркер ZO-1 является характерным для эпителиальных клеток белком плотных межклеточных контактов. Экспрессия данного маркера плотных межклеточных контактов ZO-1 подтверждает сохранность эпителиального фенотипа исследуемых клеток.

Иммуногистохимическое исследование проводилось по описанной выше стандартной методике, с использованием первичного антитела к белку ZO-1 (Abcam plc., Великобритания) и видоспецифичного вторичного антитела,

конъюгированного с флуорохромом AlexaFluor 488 в разведении 1:250 (Abcam plc., Великобритания). Экспрессия данного белка изучалась на конфокальном лазерном сканирующем биологическом микроскопе (FLUOVIEW FV10i, OLYMPUS Corporation, Япония). Объективный анализ полученных изображений проводили при помощи программного обеспечения «CellProfiler» (Broad Institute Inc., США). Результаты измерений представлены в разделе 3.3.3. главы 3.

2.3.4. Исследование микростроения слоя клеток заднего эпителия трупных донорских роговиц после вирусной деконтаминации

Микростроение слоя клеток заднего эпителия сформированных ранее фрагментов роговиц, консервированных по предлагаемой ($n = 15$) и стандартной ($n = 15$) технологии, изучалось при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM-6000Plus (JEOL, Япония). Анализ микростроения заключался в оценке межклеточных контактов, границ и морфологии клеток заднего эпителия роговицы. Также оценивалась складчатость Десцеметовой мембраны.

В ходе пробоподготовки полученные образцы роговиц обеих групп фиксировали в растворах формальдегида 4% на 24 часа. После чего образцы трижды отмывали в 1 мл фосфатного буфера (PBS). Затем подвергали дегидратации в ацетоне по следующей схеме:

- 5% раствор ацетона – 20 мин,
- 10% раствор ацетона – 20 мин,
- 30% раствор ацетона – 20 мин,
- 50% раствор ацетона – 20 мин,
- 70% раствор ацетона – 20 мин,
- 90% раствор ацетона – 20 мин,
- 100% ацетон – 3 раза по 20 мин.

Полученные дегидратированные образцы роговиц обеих групп в количестве 32 штук помещались в микропористые капсулы CPD800A (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) эндотелием вверх.

Затем проводили сушку в течение 30 минут в критической точке ($t = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 7,39\text{ МПа}$) в блоке сушки K850 (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), в ходе которой ацетон в образцах замещался на жидкий CO_2 .

По окончании данного этапа образцы роговиц обеих групп фиксировались на алюминиевых подставках при помощи карбонового скотча и токопроводящего клея эндотелием вверх.

Далее в вакуумной напылительной установке Smart Coater (Structure Probe, Inc., США) происходило создание электронно-проводящего слоя на поверхности исследуемых роговичных дисков путем напыления 5 нм слоя золота (проба 999).

После окончания пробоподготовки образцы роговиц обеих групп на алюминиевых подставках помещались в отсек сканирующего электронного микроскопа. Затем программным обеспечением активировалось создание следующих условий, в которых проводили изучение микростроения эндотелиальных клеток: высокий вакуум, ускоряющее напряжение 5 кВ.

Данный алгоритм пробоподготовки обеспечивает наилучшую сохранность микростроения ткани и взаиморасположения клеточных структур при применении со стандартным программным обеспечением производителя сканирующего электронного микроскопа.

2.3.5. Оценка стерильности консервационного раствора после вирусной деконтаминации на бактериологическом анализаторе

Исследование стерильности разработанного противовирусного раствора в рамках технологии вирусной деконтаминации проводилось на автоматизированном бактериологическом анализаторе HB&L, Alifax (Италия). Данный прибор в автоматическом режиме определяет присутствие анаэробных, аэробных и грибковых микроорганизмов, а также оценивает их рост внутри специально разработанных флаконов с различными питательными средами.

Для этого полученные на предыдущих этапах исследования аликвоты консервационных сред опытной группы объемом по 500 мкл в количестве 15 штук переносились во флаконы бактериологического анализатора HB&L для инкубации по стандартному протоколу производителя в течение 48 часов (аэробы, анаэробы) и 96 часов (грибы). После окончания исследования флаконы из анализатора HB&L направлялись на контрольный бактериологический посев по стандартной методике в Клинико-диагностическую лабораторию ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

2.4. Четвертый этап. Исследование противовирусной эффективности разработанного раствора и предлагаемой технологии в отношении вируса простого герпеса 1 типа

На данном этапе работы в эксперименте *in vitro* изучались аспекты цитотоксического действия и противовирусной эффективности разработанного раствора для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц.

Экспериментальное исследование проводилось на базе Лаборатории сравнительной вирусологии с Российским центром по герпесу Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

2.4.1. Определение цитотоксического действия разработанного раствора с использованием клеточной линии Vero в эксперименте *in vitro*

Для проведения данной части работы из ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России были переданы образцы разработанного раствора для вирусной деконтаминации и раствора для хранения роговицы в рамках заключенного договора о научном сотрудничестве между данными институтами.

Исследование проводилось на перевиваемой линии клеток почечного эпителия африканских зелёных мартышек (Vero), полученной из коллекции Лаборатории культур тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В качестве ростовой среды использовали среду DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко», Россия). В качестве среды поддержки

использовали среду DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 2% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко», Россия). Также к данным средам добавляли 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, Inc., США) и антибиотики (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 40 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия). Клеточную культуру в концентрации $\sim 1,0 \times 10^5$ кл/мл рассеивали в 96-луночные пластиковые культуральные планшеты (Corning Inc., США) и культивировали в инкубаторе при температуре $37 \pm 0,5$ °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В работе использовали однодневный клеточный монослой.

Цитотоксическое действие опытных и контрольных образцов консервационных растворов оценивали по их влиянию на морфологию и жизнеспособность культур клеток Vero. Для этого суточные культуры клеток Vero освобождали от ростовой среды, трижды отмывали теплым раствором Хэнкса, и добавляли исследуемые образцы консервационных растворов по 1 мл. В качестве отрицательного контроля использовалась среда поддержки DMEM. Затем культуры клеток Vero инкубировали при $37 \pm 0,5$ °С в CO₂-инкубаторе. Результаты оценивали ежедневно в течение 4-х суток методом световой микроскопии с использованием инвертированного микроскопа. Маркерами цитотоксического действия являлись цитодеструктивные и морфологические изменения в клеточном монослое.

Количество жизнеспособных клеток определяли методом исключения витального красителя трипанового синего. Для этого клетки ежедневно в течение 96 ч снимали смесью трипсина и версена и прижизненно окрашивали 0,4% раствором трипанового синего в течение 5 мин при $37 \pm 0,5$ °С. Затем подсчитывали число жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (голубых) клеток в камере Горяева. Жизнеспособность клеток в популяции оценивали по количеству неокрашенных клеток в процентах от общего числа клеток. В качестве контроля цитотоксического действия использовали клетки

Vero, которые инкубировали в среде поддержки DMEM. Результаты представлены в разделе 3.4.1. главы 3.

2.4.2. Оценка противовирусной активности разработанного раствора в отношении вируса простого герпеса 1 типа на примере клеточной линии Vero в эксперименте *in vitro*

Оценка противовирусной активности разработанного раствора проводилась по стандартной методике в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета Министерства Здравоохранения Российской Федерации. В качестве опытного образца выступал предложенный раствор для вирусной деконтаминации, в качестве контрольного – раствор для хранения роговицы.

Для проведения данного фрагмента работы из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, был получен тест-вирус ВПГ-1, штамм ЕС. Вирус пассировали и титровали на монослойной культуре клеток Vero. Инфекционные титры ВПГ-1 определяли стандартным методом титрования и рассчитывали по методу Рида и Менча [157], выражая в логарифмических единицах (\lg ТЦИД₅₀/0,1 мл). Лизат культуральной вируссодержащей жидкости разливали по аликвотам и сохраняли при -70 °С до проведения эксперимента. Методика культивирования клеток Vero описана выше в разделе 2.4.1. данной главы.

Структура изучения противовирусной активности заключалась в оценке подавления исследуемыми консервационными растворами цитопатического действия (ЦПД) ВПГ-1 в культуре клеток Vero, а также влияния на репродукцию ВПГ-1 в культуре клеток Vero. Противовирусную активность консервационных растворов изучали по терапевтической (через 1 ч после инфицирования) и по профилактической (за 2 ч до инфицирования) схемам.

При оценке противовирусной активности по терапевтической схеме культуру клеток Vero культивировали в 96-луночных панелях по вышеописанной методике, после чего забирали среду роста и трижды отмывали клетки теплым раствором Хэнкса. Затем клетки Vero заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀ и инкубировали в термостате при $37,0 \pm 0,5$ °С в течение 1 часа. Далее вирус удаляли, культуру клеток трижды отмывали раствором Хэнкса от неадсорбированного вируса, после чего добавляли исследуемые образцы консервационных растворов. Затем клетки Vero инкубировали при $37,0 \pm 0,5$ °С в течение 96 часов с ежедневным контролем сохранности монослоя и характера вирусспецифического ЦПД методом световой микроскопии [22].

При оценке противовирусной активности по профилактической схеме культуру клеток Vero культивировали в 96-луночных панелях по вышеописанной методике, после чего забирали среду роста и трижды отмывали клетки теплым раствором Хэнкса. Затем добавляли образцы исследуемых консервационных растворов в культуру клеток Vero, после чего инкубировали при $37,0 \pm 0,5$ °С. Спустя 2 часа исследуемые растворы удаляли, клетки отмывали теплым раствором Хэнкса и заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀. После чего инфицированную культуру клеток Vero инкубировали в термостате при $37,0 \pm 0,5$ °С в течение 1 часа. Затем вирус удаляли, культуру клеток трижды отмывали раствором Хэнкса от вируса, который не адсорбировался и добавляли среду поддержки DMEM. Затем клетки Vero инкубировали при $37,0 \pm 0,5$ °С в течение 96 часов с ежедневным контролем сохранности монослоя и характера вирусспецифического ЦПД методом световой микроскопии [22].

В качестве положительного контроля к инфицированным клеткам Vero добавляли среду поддержки DMEM. Отрицательным контролем являлись неинфицированные клетки Vero, к которым добавляли среду поддержки DMEM. Результаты учитывали при появлении выраженного (100%) вирусспецифического ЦПД в контрольных пробах.

Также оценка противовирусного действия предусматривала изучение инфекционной активности вируса, образовавшегося в присутствии консервационных растворов. Для этого на 4-е сутки совместного инкубирования зараженных культур клеток Vero с исследуемыми консервационными растворами отбирали соответствующие пробы вирусосодержащей жидкости из опытных и контрольных лунок и титровали их на перевиваемых культурах клеток Vero по стандартной методике.

Вирусингибирующий эффект исследуемых растворов оценивали по следующим показателям: снижению уровня накопления вируса под воздействием консервационного раствора, коэффициенту ингибирования.

Снижение уровня накопления вируса под влиянием консервационного раствора (Δ , lg) определяли по формуле (1):

$$\Delta = A_k - A_o \quad (1),$$

где A_k – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду консервационного раствора (lg ТЦИД₅₀/0,1 мл); A_o – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду консервационного раствора (lg ТЦИД₅₀/0,1 мл).

Коэффициент ингибирования (КИ, %) рассчитывали по формуле (2):

$$\text{КИ} = ((A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}})/A_{\text{контр}}) \times 100\% \quad (2),$$

где $A_{\text{контр}}$ – уровень накопления вируса при культивировании в питательной среде, не содержащей консервационный раствор (lg ТЦИД₅₀/0,1 мл); $A_{\text{оп}}$ – уровень накопления вируса при культивировании в среде, содержащей консервационный раствор (lg ТЦИД₅₀/0,1 мл).

Для получения достоверных результатов экспериментальные исследования данного этапа работы проводились в трех повторах. Полученные результаты оценки противовирусной эффективности консервационных растворов представлены в разделе 3.4.2. главы 3.

2.5. Пятый этап. Количественное определение синтезированных эндогенных интерферонов клетками донорской роговицы

Способность клеток и органной культуры трупной донорской роговицы продуцировать эндогенные интерфероны под действием индукторов интерферонов ранее не изучалась. Поскольку в состав предлагаемого раствора для вирусной деконтаминации, помимо аномального нуклеозида, входит индуктор интерферона, было необходимо дать количественную оценку уровням синтезированных эндогенных интерферонов.

Лабораторные исследования пятого этапа работы проводились на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

2.5.1. Получение клеточных культур кератоцитов и фибробластов

Для проведения данной части исследования из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России были получены 30 стромальных дисков, выделенные в процессе заготовки трансплантатов для задней послойной кератопластики из 15 роговиц от 15 доноров-трупов. Техника формирования срезов стромы описана в разделе 2.3.2. данной главы. Из каждой роговицы были получены 2 стромальных диска. Один из стромальных дисков использовался для получения кератоцитов, оставшийся – для получения фибробластов. Согласно классификации трансплантабельности [1; 2], склеральные диски были выделены из роговиц с показателем 3А (трансплантабельные роговицы). Характеристика использованного донорского материала представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика использованного донорского материала

Количество стромальных дисков	30
Соотношение женщин и мужчин	7/8
Возраст, лет	48 ± 6
Время от момента смерти до ввода в эксперимент, ч	16 ± 4

Каждый стромальный диск разделяли на 3 равные части для изучения влияния, соответственно, Циклоферона (индуктор интерферона, меглюмина акридоацетат), Полудана (индуктор интерферона, комплекс полиадениловой и полиуридиловой кислот) и ростовой среды (отрицательный контроль) на способность клеток роговицы вырабатывать эндогенные интерфероны.

Применялся стандартный алгоритм получения клеточного материала из образцов стромы роговицы, включающий этапы начальной ферментативной обработки, измельчения, заключительной ферментативной обработки и центрифугирования получившейся клеточной взвеси. Работа с клетками и тканями проводилась в ламинарном боксе MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Начальная кратковременная ферментативная обработка применялась для дезагрегации ткани. Для этого полученные фрагменты стромы помещали в конические пробирки типа Эппендорф (1,5 мл) и добавляли 1 мл раствора коллагеназы II типа (Thermo Fisher Scientific Inc., США) в концентрации 10 мг/мл, разведенного в среде Игла в модификации Дульбекко и среде Хэма F12 (DMEM/F12, 1:1, Sigma-Aldrich, Inc., США), содержащего в составе антибиотики (пенициллин 10000 ME/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин 25 мкг/мл, Sigma-Aldrich, Inc., США).

Далее пробирки переносили в термошейкер TS-100 (BioSan SIA, Латвия), используя следующие настройки прибора: температура 37 °C, 800 об/мин, 20 мин.

По окончании данной процедуры удаляли супернатант, добавляли среду Игла в модификации Дульбекко и среду Хэма F12 (DMEM/F12, 1:1) в объеме 1 мл, после чего оставляли на 5 минут при 37 °С.

Затем полученные образцы извлекались из пробирок и переносились в индивидуальные чашки Петри для ИГХ, диаметром 35 мм (SPL Lifesciences Co., Республика Корея). Чашки Петри 35 мм для роста кератоцитов (n = 30) и фибробластов (n = 30) соответствующе маркировались. Затем в чашки Петри 35 мм добавляли по 1 мл ростовой среды, состоящей из следующих компонентов: DMEM/F12, эмбриональная телячья сыворотка 5% (HyClone, Thermo Fisher Scientific Inc., США), 1 мг/мл L-аскорбиновая кислота (Sigma-Aldrich, Inc., США), 2 mM L-глутамин (GlutoMax, Thermo Fisher Scientific Inc., США), и 1% антибиотиков (пенициллин 10000 ME/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин 25 мкг/мл; Sigma-Aldrich, Inc., США). После чего помещали в CO₂-инкубатор NU-5510 (NuAire, США) в стандартные условия (37 °С, 100% влажность, 5% CO₂) на 7 суток для получения кератоцитов и на 14 суток – для получения фибробластов. Замена ростовой среды проводилась каждые 3 дня. Контроль роста клеток оценивался при помощи инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа IX81 (Olympus, Япония) с интегрированной цифровой фотокамерой XC10 (Olympus, Япония).

Спустя 7 суток достигался уровень конfluence кератоцитов 70-80%, после чего из чашек Петри 35 мм забирали ростовую среду. Полученные клеточные культуры разделялись на 3 группы в зависимости от добавляемой ростовой среды: в группу № 1 вносили 3 мл ростовой среды с Циклофероном в концентрации 1 мг/100 мл, в группу № 2 – 3 мл ростовой среды с Полуданом в концентрации 1000 ЕД/100 мл, в группу № 3 – 3 мл ростовой среды (отрицательный контроль). Затем проводили культивирование в стандартных условиях (37 °С, 100% влажность, 5% CO₂) в течение 24 часов, после чего образцы сред из каждой чашки Петри (n = 45) собирали в отдельные стерильные

пробирки типа Эппендорф 1,5 мл для проведения анализа на содержание в них интерферонов.

В ходе получения фибробластов, по достижении 80% конfluэнтности (на 7-е сутки), клетки пассировали. Для этого полученные клетки 3-хкратно промывались раствором Версена, после чего добавляли раствор Трипсин-Версена (1:1) и инкубировали при 37 °С в течение 10 минут. Образованную клеточную суспензию собирали в пробирки (объемом 15 мл) и центрифугировали при 1100 об/мин в течение 5 мин при 37 °С (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Образовавшийся супернатант удалялся при помощи аспиратора, осадок ресуспендировали в 1 мл соответствующей полной ростовой среды, проводили подсчет клеток в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos Biosystems, Республика Корея) и переносили в новые чашки Петри 35 мм.

Затем добавляли 1 мл ростовой среды и культивировали еще 7 суток в стандартных условиях (37 °С, 100% влажность, 5% CO₂) до достижения конfluэнтности 90-100%, после чего забирали ростовую среду. Полученные клеточные культуры разделялись на 3 группы в зависимости от добавляемой ростовой среды: в группу № 1 вносили 3 мл ростовой среды с Циклофероном в концентрации 1 мг/100 мл, в группу № 2 – 3 мл ростовой среды с Полуданом в концентрации 1000 ЕД/100 мл, в группу № 3 – 3 мл ростовой среды (отрицательный контроль). Затем проводили культивирование в стандартных условиях (37 °С, 100% влажность, 5% CO₂) в течение 24 часов, после чего образцы сред из каждой чашки Петри (n = 45) собирали в отдельные стерильные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл для проведения анализа на содержание в них интерферонов.

2.5.2. Иммуноцитохимический анализ использованных клеточных культур

Для верификации фенотипа полученных клеточных культур кератоцитов и фибробластов проводилось иммуноцитохимическое исследование. Данное исследование выполнялось по стандартной методике, которая заключается в

первоначальной фиксации полученных клеток, дальнейшей пермеабиллизации (обработка клеток химическими веществами с целью повышения проницаемости мембран), окрашивании образцов первичными антителами, затем следует окраска вторично-меченными антителами, контрастирование клеточных ядер, после чего получившиеся препараты помещаются под покровное стекло.

Применялся следующий алгоритм подготовки препаратов к иммуноцитохимическому исследованию:

шаг 1 – фиксация клеточных культур кератоцитов и фибробластов в 10% растворе формалина (рН 7,4) на протяжении 10 минут при температуре 25 °С;

шаг 2 – образцы отмывались от фиксатора холодным (4 °С) раствором фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) троекратно по 5 минут;

шаг 3 – пермеабиллизацию клеточных мембран проводили 0,25% раствором Triton-X100 в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут;

шаг 4 – образцы отмывались от фиксатора холодным (4 °С) раствором фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) троекратно по 5 минут;

шаг 5 – для снижения неспецифического связывания антител образцы обрабатывали раствором фосфатно-солевого буфера и 1% бычьего сывороточного альбумина с добавлением 0,1% Tween 20;

шаг 6 – полученные образцы совместно с первичными антителами, разведенными в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Tween 20, инкубировали в течение 1 часа при температуре 25 °С. Используемые первичные антитела представлены в таблице 6;

шаг 7 – образцы отмывались от первичных антител раствором фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) троекратно по 5 минут при температуре 25 °С;

шаг 8 – для определения первичных антител к культуре кератоцитов и фибробластов добавлялись вторичные антитела, конъюгированные с

флуорохромным красителем, которые предварительно разводились в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Tween 20, после чего проводили инкубацию в течение 1 часа. И использованные вторичные антитела представлены в таблице 7;

шаг 9 – образцы отмывались от вторичных антител раствором фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) троекратно по 5 минут при температуре 25 °С;

шаг 10 – проводили контрастирование ядер бис-бензидимом (Hoechst 33258) в концентрации 0,1 мг/мл в растворе фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) в течение 10 минут при комнатной температуре;

шаг 11 – образцы отмывались раствором фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) троекратно по 5 минут при температуре 25 °С;

шаг 12 – подготовленные образцы кератоцитов и фибробластов монтировали фиксирующим раствором под покровное стекло, после чего хранили при температуре 4 °С не более 48 часов.

Таблица 6 – И использованные первичные антитела

И использованные антитела	Разведение антитела	Источник
α-гладкомышечный актин	1:100	мышь
Кератокан	1:100	кролик
Виментин	1:100	мышь

Таблица 7 – И использованные вторичные антитела

И использованные антитела	Разведение антитела	Флуорохромный краситель
Козлиные против мыши (Goat anti-Mouse)	1:250	Alexa Fluor 594 (Ex590; Em617)
Козлиные против кролика (Goat anti-Rabbit)	1:250	Alexa Fluor 488 (Ex495; Em519)

Оценка подготовленных образцов проводилась на конфокальном лазерном сканирующем биологическом микроскопе (FLUOVIEW FV10i, OLYMPUS Corporation, Япония).

Анализ полученных изображений проводился при помощи программного обеспечения «CellProfiler» (Broad Institute Inc., США). Полученные данные представлены в разделе 3.5.2. главы 3.

2.5.3. Иммуноферментный анализ супернатантов культуры кератоцитов и фибробластов стромы роговицы человека

Уровни содержания эндогенных ИФН- α и ИФН- β в собранных образцах сред оценивались при помощи иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов ELISA Kit IFNa, IFNb (Cloud-Clone Corp., США).

Пробоподготовка полученных супернатантов клеточных культур заключалась в центрифугировании образцов в течение 20 минут при ускорении 1000g. Затем проводили иммуноферментный анализ сэндвич-методом, который заключался в следующем. На поверхность твердой фазы сорбированы антитела, специфичные к одному из эпитопов анализируемого антигена (ИФН- α , либо ИФН- β). В результате добавления образца, содержащего искомым антиген, и инкубации, на поверхности твердой фазы формировался специфический комплекс антиген-антитело. После четырехкратной обработки промывающим раствором добавляли связанные с ферментом (пероксидаза хрена) антитела ко второму эпитопу искомого антигена и повторяли инкубацию. В результате формировались комплексы, в которых молекула антигена фиксирована между двумя молекулами антител. После повторной четырехкратной обработки промывающим раствором для обнаружения сформированных комплексов добавляли субстрат, который при взаимодействии с ферментом окрашивает только те лунки, которые содержат искомым интерферон. Интенсивность окрашивания зависит от количества

интерферона в лунке. Ферментная реакция прекращалась добавлением раствора серной кислоты. После чего незамедлительно микропланшеты загружались в спектрофотометр для анализа оптической плотности на определенной длине волны. Анализ оптической плотности в лунках микропланшета проводился при помощи микропланшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., США), при длине волны 450 ± 10 нм.

Результаты иммуноферментного анализа в виде количества синтезированных клетками эндогенных интерферонов (пг) в 1 мл среды представлены в разделе 3.5.3. главы 3.

2.5.4. Иммуноферментный анализ образцов консервационных растворов

Предстояло оценить влияние суточной органотипической консервации по предлагаемой технологии и оригинальной рецептуры разработанного консервационного раствора на способность роговиц вырабатывать собственный интерферон *ex vivo*.

Для этого полученные в ходе третьего этапа исследования образцы консервационных растворов ($n = 18$) исследовались методом иммуноферментного анализа на количественное содержание в них эндогенных интерферонов 1 типа (интерферона- α и интерферона- β).

В опытную группу входили образцы раствора для вирусной деконтаминации ($n = 9$), в контрольную группу – образцы раствора для хранения роговицы ($n = 9$). Пробоподготовка опытных и контрольных консервационных растворов заключалась в центрифугировании данных образцов в течение 20 минут при ускорении 1000g. Затем проводили иммуноферментный анализ сэндвич-методом по алгоритму, описанному в предыдущем разделе исследования.

Результаты проведенного иммуноферментного анализа в виде количества синтезированных клетками эндогенных интерферонов (пг) в 1 мл консервационного раствора представлены в разделе 3.5.4. главы 3.

2.6. Шестой этап. Применение технологии вирусной деконтаминации в эксперименте *ex vivo*

На данном этапе работы изучалась способность разработанного консервационного раствора и технологии вирусной деконтаминации оказывать противовирусный эффект на инфицированную вирусом простого герпеса 1 типа ткань роговицы.

2.6.1. Оценка противовирусной эффективности предлагаемой технологии на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов

Для проведения данной части исследования из Отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в ходе операций по пересадке роговицы были получены 12 патологически измененных роговичных дисков от 12 реципиентов с герпетическими кератитами в анамнезе. Исследование на тканях реципиентов проводилось в соответствии с официально принятыми процедурами, биомедицинскими этическими нормами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ. Характеристика использованного материала реципиентов представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Характеристика использованного материала реципиентов

Количество роговичных дисков	12
Соотношение женщин и мужчин	5/7
Средний возраст, лет	42 (± 7)

Патологически измененные роговицы реципиентов в пробирках типа Эппендорф 1,5 мл доставлялись в Центр фундаментальных и прикладных медико-

биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Затем каждая роговица разделялась на две равные части. Одна часть входила в опытную группу, оставшаяся – включалась в контрольную. Образцам присваивались индивидуальные номера. Роговичные диски опытной группы помещали в 20 мл флаконы с раствором для вирусной деkontаминации и подвергали нормотермической (37 °С) органотипической консервации в течение 24 часов в термостате ТС-1/80-СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия), согласно предлагаемой технологии. Роговичные диски контрольной группы помещали в 20 мл флаконы с раствором для хранения роговицы и подвергали гипотермической (4 °С) консервации в течение 24 часов по стандартной технологии в лабораторном холодильнике.

Выделение ДНК, её анализ и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени проводились на базе Клинико-диагностической лаборатории ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по стандартной методике, описанной в разделе 2.1. данной главы, за исключением того, что количество ДНК в ПЦР-смеси составляло 10 нг (с целью повышения чувствительности метода).

2.6.2. Оценка противовирусной эффективности предлагаемой технологии на трупных донорских роговицах в глазном тканевом банке

Для проведения заключительного исследования из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России были получены 18 глаз от 9 доноров-трупов. Исследовались жизнеспособные роговицы с показателями по классификации трансплантатбельности 1А, 1В (нетрансплантатбельные роговицы), в эпителии которых содержался вирус простого герпеса 1 типа, что было верифицировано методом ПЦР. Характеристика использованного донорского материала представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика использованного донорского материала

Количество роговично-склеральных дисков	18
Соотношение женщин и мужчин	4/5
Средний возраст, лет	55 (± 3)
Среднее время от момента смерти до ввода в эксперимент, ч	19 (± 1)

Исследуемые на данном этапе роговично-склеральные диски доноров-трупов заготавливались в операционной глазного тканевого банка в условиях ламинарного шкафа в соответствии с «Алгоритмом заготовки трупных роговиц человека для трансплантации» [1]. Скарифицированный роговичный эпителий исследовался на наличие ВПГ-1 при помощи ПЦР. С помощью трепана формировали роговично-склеральные диски диаметром 16 мм ($n = 18$). В ожидании результатов диагностического ПЦР-анализа роговицы помещали в раствор для хранения роговицы и подвергали суточной гипотермической консервации ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), после чего разделяли на две группы. Роговицы опытной группы ($n = 9$), согласно предлагаемой технологии, помещали в раствор для вирусной деконтаминации для суточной органотипической консервации при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Роговицы контрольной группы ($n = 9$) продолжали хранить в условиях гипотермии в течение 24 часов согласно стандартной технологии. Затем роговицы обеих групп выводились из эксперимента и направлялись на ПЦР-исследование для обнаружения ВПГ-1.

Выделение ДНК из биологического материала и оценка присутствия ДНК ВПГ-1 в соскобах эпителия и роговицах проводилась методом ПЦР на амплификаторе CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories Inc., США) в Клинико-диагностической лаборатории ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по стандартной методике, описанной в разделе 2.1. данной главы, за исключением того, что количество ДНК в ПЦР-смеси составляло 10 нг (с целью повышения чувствительности метода).

2.7. Методы статистической обработки результатов исследования

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием методов описательной статистики при помощи стандартного программного обеспечения с функциями статистической обработки (Microsoft Excel). Результаты статистической обработки представлены в формате $M \pm \sigma$, где M – среднее значение; σ – стандартное отклонение. Оценка достоверности различий между двумя независимыми группами проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при коэффициенте достоверности $p < 0,05$. Полученные статистические данные представлены в таблицах результатов соответствующих разделов исследования.

2.8. Перечень используемого лабораторного оборудования и расходных материалов

В данном исследовании применялись: лабораторное оборудование, питательные среды и реактивы, лабораторная посуда и микрохирургический инструментарий, представленные, соответственно, в таблицах 10, 11, 12 и 13.

Таблица 10 – Список лабораторного оборудования

Наименование	Компания-производитель
Кератоанализатор для Глазных банков ЕКА-98	Konan Medical Inc., Япония
Амплификатор CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories Inc., США
Гомогенизатор HG-15A-Unit	Daihan Scientific Co. Ltd., Южная Корея
Термостат ТС-1/80-СПУ	ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия
Конфокальный лазерный сканирующий биологический микроскоп FLUOVIEW FV10i	Olympus Corporation, Япония
Микрокератом LSK	Moria Inc., Франция
Искусственная передняя камера глаза ALTK	Moria Inc., Франция
Оптический когерентный томограф iVue100	Optovue, США
Сканирующий электронный микроскоп JCM-6000Plus	JEOL, Япония
Сушилка для образцов K850	Quorum Technologies Ltd., Великобритания
Вакуумная напылительная установка Smart Coater	Structure Probe Inc., США
Автоматизированный бактериологический анализатор HB&L	Alifax, Италия
Ламинарный шкаф II класса микробиологической защиты MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc., США
Центрифуга многофункциональная SL 40	
Термошейкер TS-100	BioSan SIA, Латвия
Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX81 с интегрированной цифровой фотокамерой XC10	Olympus Corporation, Япония
Лабораторный CO ₂ -инкубатор NU-5510	NuAire, США
Автоматический счетчик клеток Luna II	Logos Biosystems, Республика Корея
Микропланшетный / кюветный спектрофотометр Multiskan GO	Thermo Fisher Scientific Inc., США

Таблица 11 – Питательные среды и реактивы для культивирования клеток

Наименование	Компания-производитель
Среда Игла в модификации Дульбекко и Среда Хэма (F12) в соотношении 1:1 DMEM/F12	Sigma-Aldrich Inc., США
Смесь антибиотиков (пенициллин 10000 МЕ/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин 25 мкг/мл)	
Базовая питательная среда Игла MEM	
Эмбриональная телячья сыворотка FBS	Thermo Fisher Scientific Inc., США
L - глутамин	
Коллагеназа II типа	
Базовая питательная среда 199	ПанЭко, Россия
Раствор Трипсин-Версена 0,25%	
Раствор Версена	
Фосфатно-солевой буферный раствор	
Диметилсульфоксид (ДМСО)	
Кислота L-аскорбиновая	Sigma-Aldrich Inc., США
Формалин	PanReac AppliChem, Германия
Triton-X100	
Twen 20	
Live and Dead	Abcam plc., Великобритания
Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза	
ZO-1	
α-Гладкомышечный актин	
Виментин	
Вторичные антитела козлиные против мыши (Goat anti-Mouse)	
Вторичные антитела козлиные против кролика (Goat anti-Rabbit)	
Ноеchst 33258 Straining Dye Solution	
Кератокан	Santa-Cruz Biotechnology Inc., США

Таблица 12 – Список использованной лабораторной посуды

Наименование	Компания-производитель
Чашки Петри 35 мм	SPL Lifesciences Co., Республика Корея
Слайд-флакон для проведения иммуноцитохимического анализа	
Чашка Петри 100 мм	Corning Inc., США
Пробирки центрифужные, 15 мл	
Криопробирки, 2,0 мл	
Флаконы культуральные, 25см ²	
Пробирки типа Эппендорф, 1,5 мл	Genfollower Biotech Co. Ltd., Китай
Дозаторы 1- и 8- канальные Ленпипет	Thermo Fisher Scientific, Ленпипет, Россия
Насадки для дозатора	
Флаконы, стекло-БСС с винтовым горлом и крышкой, герметичные, 20 мл	Detalab S.L., Испания

Таблица 13 – Микрохирургический инструментарий

Наименование	Компания-производитель
Трепан 16 мм	Surgistar Inc., США
Поставка-фиксатор для глазного яблока	ООО ЭТП «МГ», Россия
Пинцет роговичный типа Колибри	ООО «Титан серджикл», Россия
Пинцет роговичный по Каталано	
Пинцет анатомический	
Ножницы роговичные по Кастровьехо, правые	
Ножницы роговичные по Кастровьехо, левые	

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ

Разработка технологии вирусной деконтаминации донорских роговиц на этапе консервации включала: изучение распространенности ВПГ-1 в кадаверном материале Глазного тканевого банка, создание противовирусного консервационного раствора, изучение влияния предложенного раствора и технологии на клетки роговицы человека, а также исследование противовирусных свойств предложенного раствора, анализ способности клеток и ткани роговицы вырабатывать эндогенный интерферон, заключительную оценку противовирусной эффективности на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов и трупных донорских роговицах глазного тканевого банка.

Результаты проведенного исследования представлены в данной главе поэтапно в зависимости от выполненных задач.

3.1. Результаты эпидемиологического исследования по обнаружению вируса простого герпеса 1 типа в донорском материале глазного тканевого банка

На сегодня контаминация донорской роговицы вирусом простого герпеса 1 типа рассматривается как одна из возможных причин, приводящих к отторжению трансплантата после сквозных и послойных кератопластических операций.

При этом известно, что социально-экономический уровень жизни человека оказывает непосредственное влияние на результат трансплантации и на вероятность присутствия вируса простого герпеса 1 типа в донорском материале. К сожалению, ранее не проводились исследования, посвященные определению доли контаминированных ВПГ-1 трупных донорских роговиц в Глазных тканевых банках на территории России.

Ввиду особенностей социально-экономического состава доноров-трупов г. Москвы, а также в связи с необходимостью получения актуальных эпидемиологических данных и способностью ВПГ-1 находиться не только в крови, но и в ткани роговицы доноров-трупов, на данном этапе работы было необходимо провести анализ трупных донорских роговиц глазного тканевого банка на предмет наличия ДНК ВПГ-1.

При этом подобный анализ необходимо проводить современным высокоточным методом исследования – полимеразной цепной реакцией. Данный метод молекулярной биологии используется для обнаружения ДНК в образце материала. Процесс амплификации ДНК, лежащий в основе ПЦР, заключается в многократном копировании определенного участка искомой ДНК для её накопления и распознавания. Основным преимуществом данного метода является высокая чувствительность, близкая к ста процентам.

В связи с этим для проведения данной части исследования 32 трупные донорские роговицы, полученные из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, были изучены методом полимеразной цепной реакции на предмет наличия ДНК ВПГ-1.

При статистическом анализе полученных данных было установлено, что средний возраст доноров составил 54 года ($\pm 3,41$ года). ДНК вируса простого герпеса 1 типа была обнаружена в 16,62% роговиц (5/32 роговиц), что соответствовало 3 из 16 доноров (18,75%).

Проводилась оценка контаминированности роговиц в зависимости от показателя адреналиновой (функциональной) скрининг-пробы. Было установлено, что из 5 инфицированных роговиц 2 (40%) имели показатель «С» по данному тесту, 2 – показатель «В» (40%), и 1 – показатель «А» (20%). Из 27 неинфицированных роговиц 11 имели показатель «А» (40,74%), 8 – показатель «В» (29,63%), 8 – показатель «С» (29,63%). Результаты ПЦР-анализа представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результат ПЦР-исследования ткани трупных донорских роговиц на присутствие ДНК вируса простого герпеса 1 типа

Порядковый номер донора	Возраст донора	Пол	Критерий трансплантатбельности		ДНК ВПГ-1
			OD	OS	
1	51	м	1С	1С	не обнаружена
2	63	ж	1В	1В	OU: обнаружена
3	52	ж	1В	1В	не обнаружена
4	58	м	1С	1С	не обнаружена
5	45	ж	1А	1А	не обнаружена
6	48	м	1В	1В	не обнаружена
7	60	ж	1С	1С	не обнаружена
8	63	м	1В	1В	не обнаружена
9	41	м	1А	1А	OD: обнаружена OS: не обнаружена
10	50	ж	1А	1А	не обнаружена
11	55	м	1В	1В	не обнаружена
12	47	ж	1А	1А	не обнаружена
13	61	м	1С	1С	OU: обнаружена
14	49	м	1А	1А	не обнаружена
15	65	ж	1С	1С	не обнаружена
16	54	м	1А	1А	не обнаружена

Концентрация выделенной ДНК составляла от 40 до 100 нг/мкл. В результате проведенного дополнительного фрагментарного анализа целостности геномной ДНК была установлена длина фрагментов ДНК, которая составила от 6 до 10 килобаз, что говорит о её высоком качестве.

Таким образом, по результатам проведенного этапа работы можно сделать вывод о контаминированности 16,62% донорского материала, поступающего в Глазной тканевой банк, вирусом простого герпеса 1 типа. Установлена возможность контаминации одной роговицы в паре от одного донора. Присутствие данного вируса в трупных донорских роговицах Глазного тканевого банка означает не только возможность его передачи в ходе кератопластических операций неинфицированным реципиентам, но и увеличивает риск отторжения трансплантата по причине развития послеоперационных патологических реакций.

3.2. Консервационный раствор для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц

В качестве средства для вирусной деконтаминации трансплантата роговицы в соответствии с поставленными задачами исследования был разработан консервационный раствор с противовирусными свойствами. За счет входящих в его состав компонентов удалось добиться сочетания консервационного, противовирусного и иммуномодулирующего эффектов.

Консервационные и иммуномодулирующие свойства разработанного раствора изучались на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Противовирусный эффект созданного раствора обусловлен входящим в его состав аномальным нуклеозидом и индуктором интерферона, который стимулирует выработку эндогенных интерферонов. Используемые фармакологические препараты при совместном применении, по данным литературы, усиливают действие друг друга, вызывают синергетический противовирусный эффект. Подробно противовирусные свойства разработанного раствора изучались на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Полученные результаты исследований противовирусной активности созданного раствора представлены далее в данной главе.

Задействовать естественные противовирусные системы роговицы возможно благодаря особенностям её клеточного состава. Известно, что с точки зрения эмбриологии роговица представляет собой уникальное образование, в котором передний эпителий образован из поверхностной эктодермы, строма и задний эпителий – из клеток нервного гребня эктодермы. Строма является наиболее объемным слоем роговицы (около 90% объема роговицы), и состоит из кератоцитов и коллагеновых пластинок. Кератоциты – основные клеточные элементы стромы, занимающие около 10% её объема, представляют собой высокодифференцированные фибробласты. Известно, что в 1 мм³ роговицы

человека содержится порядка 20000 кератоцитов. При этом фибробласты и кератоциты в эмбриогенезе имеют общее мезенхимное происхождение. Этим обусловлена способность кератоцитов переходить в фибробласты под действием факторов внешней среды. В свою очередь фибробласты способны активно синтезировать интерферон при стимуляции, в том числе индукторами интерферона, поскольку на их мембране экспрессируются рецепторы TLR-3, способные инициировать запуск противовирусного внутриклеточного каскада, приводящего к локализации и элиминации вирусной инфекции. На сегодня считается, что фибробластами преимущественно синтезируется интерферон- β (фибробластный интерферон), лейкоцитами – интерферон- α (лейкоцитарный интерферон), естественными киллерами и макрофагами – интерферон- γ (иммунный интерферон). С учетом данных условий, активация естественных противовирусных систем клетки во время консервации способствует эффективной вирусной деконтаминации.

Одним из противовирусных компонентов раствора является ганцикловир. Данный препарат относится к фармакологической группе аномальных нуклеозидов и обладает выраженным противовирусным действием в отношении герпесвирусов, в том числе ВПГ-1. Внутри инфицированных клеток под действием вирусной тимидинкиназы ганцикловир фосфорилируется. Образовавшийся ганцикловиртрифосфат нарушает цикл репродукции ВПГ-1 внутри клетки за счет конкурентного ингибирования вирусной ДНК-полимеразы и встраивания в вирусную ДНК. Образующаяся ДНК не обладает инфекционными свойствами.

Также противовирусный эффект созданного раствора обеспечивается условиями консервации. Состав раствора для вирусной деконтаминации подразумевает его использование при органном культивировании. Необходимость повышения температуры консервации до 37-38 °С обусловлена диапазоном температурной активности противовирусных звеньев врожденного иммунитета. Так, иммунные и регуляторные активности интерферонов проявляются при

повышенной температуре, которая также способствует ускорению пролиферативной активности и метаболизма клеток роговицы. Температурный режим консервации дополнительно оказывает прямое воздействие на ВПГ-1, поскольку данный вирус является термолабильным (неустойчивым к температурному воздействию), он способен инактивироваться в условиях гипертермии, при этом значительно легче переносит низкие температуры. Так, при температуре 37 °С инактивация ВПГ-1 происходит в течение 10 часов.

Консервационный эффект созданного раствора обусловлен базисной консервационной средой. В качестве такой основы была использована среда для консервации донорских роговиц, которую предложили С.Н. Федоров, З.И. Мороз, С.А. Борзенко, Ю.А. Комах (патент РФ № 93010287). По нашему мнению, раствор противовирусного назначения по обозначенным выше причинам должен быть адаптирован для органного культивирования. В связи с этим был подобран оптимальный состав компонентов раствора для вирусной деконтаминации. Состав раствора для вирусной деконтаминации и соотношения компонентов представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Компоненты раствора и их соотношения, на 100 мл

Компоненты	Количество
Среда 199	25,0 мл
Среда Хэма F-10	25,0 мл
Хондроитин-сульфат А	0,5 г
Декстран-T500	5,0 г
Гентамицин-сульфат	0,00014 г
Амфотерицин В	0,00015 г
Циклоферон	1 мг
Ганцикловир	0,5 мг
Среда Дульбекко-Игла	остальное

Поскольку слой клеток заднего эпителия роговицы (эндотелия) поддерживает прозрачность и нормальную гидратацию за счёт насосной функции, наиболее оптимальным в составе консервационного раствора является выбор трех сред – среды 199, среды Хэма F-10 и среды Дульбекко-Игла в заявленных соотношениях, так как это имитирует аминокислотный и метаболический состав водянистой влаги передней камеры интактного глаза, а также пролонгирует клеточный метаболизм консервированной донорской роговицы.

Декстран-Т500 имеет молекулярную массу 500000 D, относится к высокомолекулярным онкотическим компонентам раствора и, таким образом, подобранный в заявленной концентрации, предотвращает процесс набухания клеток и коллоидного вещества стромы донорской роговицы в процессе краткосрочной органотипической консервации.

Для предотвращения роста патогенной микрофлоры в состав раствора включены: гентамицин-сульфат, оказывающий бактерицидное действие в отношении широкого спектра грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, и амфотерицин В, обладающий фунгицидным и фунгистатическим действиями.

Препарат ганцикловир относится к фармакологической группе аномальных нуклеозидов и обладает противовирусной активностью в отношении герпесвирусов. Усиливает действие индукторов интерферонов.

Препарат Циклоферон (меглумина акридонацетат) представляет собой иммуностимулирующее средство – индуктор эндогенных интерферонов. Обладает противовирусной, в т.ч. противогерпетической активностью за счет активации врожденных биологических внутриклеточных механизмов противовирусной защиты. Усиливает действие аномальных нуклеозидов.

Повышение концентраций противовирусных компонентов, выше рекомендованных производителем, приводило к ускорению гибели клеток. Снижение концентрации Циклоферона уменьшало продукцию интерферонов.

Раствор для вирусной деконтаминации донорских роговиц производится согласно следующей инструкции: в условиях ламинарной комнаты в химически чистую и стерильную мерную колбу сливают вместе две среды: 25 мл среды 199 и 25 мл среды Хэма F-10. Далее последовательно вносят 0,00014 г гентамицин-сульфата, 0,00015 амфотерицина В. Состав разделяют на две равные части по 25 мл и растворяют в первой части 5 г декстрана-T500, а во второй части 0,5 г хондроитин-сульфата А путем медленного нанесения сухого вещества на поверхность жидкой смеси. После внесения указанных компонентов растворы оставляют до полного набухания на 80-120 минут, после чего полностью растворяют. Затем оба раствора сливают вновь вместе в мерную колбу, добавляют Циклоферон в количестве 1 мг, ганцикловир в количестве 0,5 мг и среду Дюльбекко-Игла до метки 100 мл. Затем, после префильтрации через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм, полученные 100 мл раствора для вирусной деконтаминации донорской роговицы, разливают по 20 мл во флаконы, с одновременной «глубинной стерилизацией» через систему миллиметровых фильтров с диаметром пор 0,22 мкм. Флаконы укупориваются стерильными крышками и помещаются в холодильник для хранения при температуре 4 °С не более суток, либо используются сразу для вирусной деконтаминации при температуре 37 °С.

Полученный раствор для вирусной деконтаминации используют следующим образом. В условиях стерильного бокса выкраивают роговицу с ободком склеры диаметром 16 мм и помещают во флакон с раствором для хранения роговицы, полученный по патенту №2069951, в условия гипотермии (4-8 °С). Спустя 24 часа роговицу переносят в предварительно подготовленный раствор для вирусной деконтаминации, плотно закрывают и консервируют при температуре 37 °С в течение 24-х часов, после чего переносят в раствор для хранения роговицы, в условия гипотермии (4-8 °С) и хранят в нём.

На созданный консервационный раствор для вирусной деконтаминации донорских роговиц получен патент РФ №2745114.

Таким образом, разработанный консервационный раствор для вирусной деконтаминации, характеризующийся противовирусной эффективностью в отношении вируса простого герпеса 1 типа, позволяет проводить эффективную вирусную деконтаминацию трупных донорских роговиц на этапе консервации в условиях глазного тканевого банка.

3.3. Результаты изучения влияния разработанного раствора и предлагаемой технологии на задний эпителий трупных донорских роговиц

В данном разделе исследования оценивалось влияние предлагаемой технологии и разработанного консервационного раствора на эндотелиальные клетки (задний эпителий) трупных донорских роговиц в сравнении с базисной технологией консервации и раствором для хранения роговицы в течение 6 суточной консервации и по ее окончании. Проведенные исследования клеток заднего эпителия включали оценку: морфометрических характеристик, жизнеспособности, функциональной активности, фенотипической характеристики и микростроения. Также проводилось исследование стерильности консервационного раствора после вирусной деконтаминации.

3.3.1. Морфометрические характеристики клеток заднего эпителия

В динамике ежедневно оценивались следующие изменения морфометрических характеристик клеток заднего эпителия: плотность, площадь и критерий гексагональности. Результаты измерения морфометрических характеристик опытной и контрольной групп на 1-е, 2-е, 3-и, 6-е сутки консервации представлены в таблицах 16, 17, 18, 19, соответственно. Графическое изображение динамики изменения плотности эндотелиальных клеток исследуемых групп представлены на рисунке 1.

Таблица 16 – Морфометрические характеристики эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах на 1-е сутки консервации

1-е сутки, опытная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2268	420	47
2	2232	447	45
3	2239	441	44
4	2238	442	49
5	2298	402	51
6	2236	444	46
7	2246	433	48
8	2265	423	46
9	2250	429	45
10	2276	413	44
11	2247	432	48
12	2283	408	45
13	2249	430	47
14	2267	421	50
15	2240	440	45
М ± σ	2255,60 ± 16,45	428,33 ± 11,07	46,67 ± 1,78
1-е сутки, контрольная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2275	414	48
2	2232	447	46
3	2245	434	45
4	2231	448	49
5	2292	404	50
6	2246	433	46
7	2248	431	48
8	2269	419	46
9	2249	430	45
10	2270	418	43
11	2263	425	49
12	2281	410	46
13	2238	442	45
14	2271	417	49
15	2238	442	47
М ± σ	2256,53 ± 16,70	427,60 ± 11,49	46,80 ± 1,65

Таблица 17 – Морфометрические характеристики эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах на 2-е сутки консервации

2-е сутки, опытная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2265	423	46
2	2231	448	45
3	2237	443	43
4	2238	442	49
5	2297	403	51
6	2236	444	45
7	2243	437	47
8	2263	425	46
9	2248	431	44
10	2275	414	44
11	2238	442	47
12	2282	409	44
13	2248	431	47
14	2266	422	49
15	2232	447	44
М ± σ	2253,27 ± 17,12	430,73 ± 11,79	46,07 ± 1,81
2-е сутки, контрольная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2274	415	47
2	2229	450	45
3	2243	437	44
4	2227	452	48
5	2289	406	49
6	2244	436	45
7	2246	433	47
8	2268	420	45
9	2248	431	44
10	2266	422	42
11	2262	426	48
12	2280	411	45
13	2237	443	44
14	2269	419	49
15	2235	445	44
М ± σ	2254,47 ± 16,90	429,73 ± 11,88	45,73 ± 1,81

Таблица 18 – Морфометрические характеристики эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах на 3-и сутки консервации

3-и сутки, опытная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2262	426	45
2	2228	451	44
3	2238	442	42
4	2235	445	48
5	2291	405	50
6	2232	447	44
7	2241	439	46
8	2258	427	45
9	2245	435	44
10	2272	416	43
11	2230	449	45
12	2279	412	42
13	2240	440	43
14	2262	426	48
15	2225	453	42
М ± σ	2249,20 ± 17,17	434,20 ± 12,43	44,73 ± 1,85
3-и сутки, контрольная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2271	417	46
2	2225	453	44
3	2240	440	43
4	2224	454	47
5	2286	407	48
6	2241	439	44
7	2243	437	45
8	2265	423	44
9	2245	435	43
10	2262	426	41
11	2255	428	46
12	2276	413	44
13	2228	451	42
14	2266	422	49
15	2231	448	43
М ± σ	2250,53 ± 16,97	432,87 ± 12,54	44,60 ± 1,79

Таблица 19 – Морфометрические характеристики эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах на 3-и сутки консервации

6-е сутки, опытная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2178	470	40
2	2202	462	41
3	2173	472	35
4	2206	461	45
5	2267	421	44
6	2171	474	37
7	2153	480	40
8	2219	457	41
9	2165	476	38
10	2223	455	40
11	2152	481	39
12	2240	440	40
13	2172	473	37
14	2233	446	46
15	2145	483	38
М ± σ	2193,27 ± 31,62	463,40 ± 13,57	40,07 ± 2,22
6-е сутки, контрольная группа			
Образец, №	Плотность эндотелиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь эндотелиальных клеток, мкм ²	Показатель гексагональности, %
1	2189	466	41
2	2176	471	40
3	2173	472	36
4	2179	469	42
5	2242	438	44
6	2178	470	39
7	2161	478	38
8	2229	450	42
9	2168	475	37
10	2217	458	40
11	2185	467	43
12	2229	450	42
13	2164	477	36
14	2239	441	47
15	2156	479	38
М ± σ	2192,33 ± 25,91	464,07 ± 11,11	40,33 ± 2,49

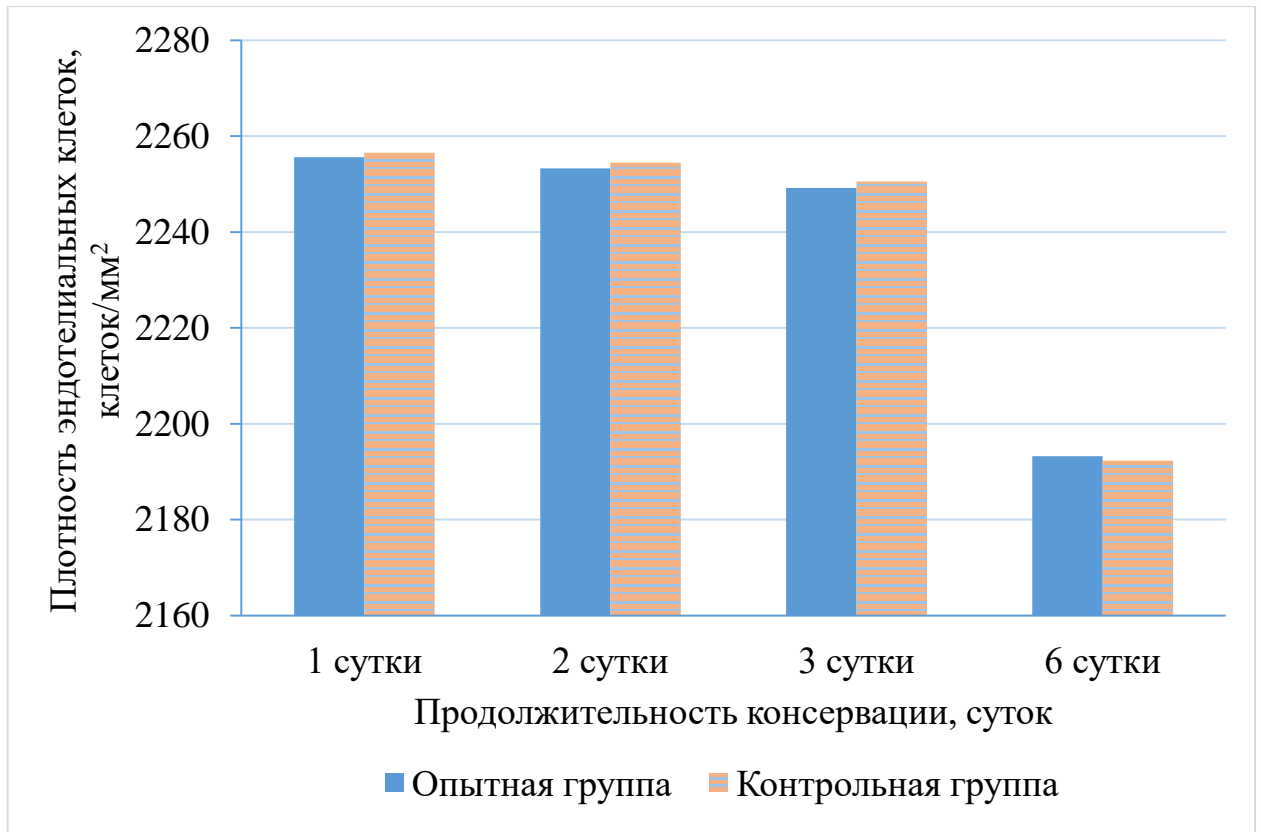


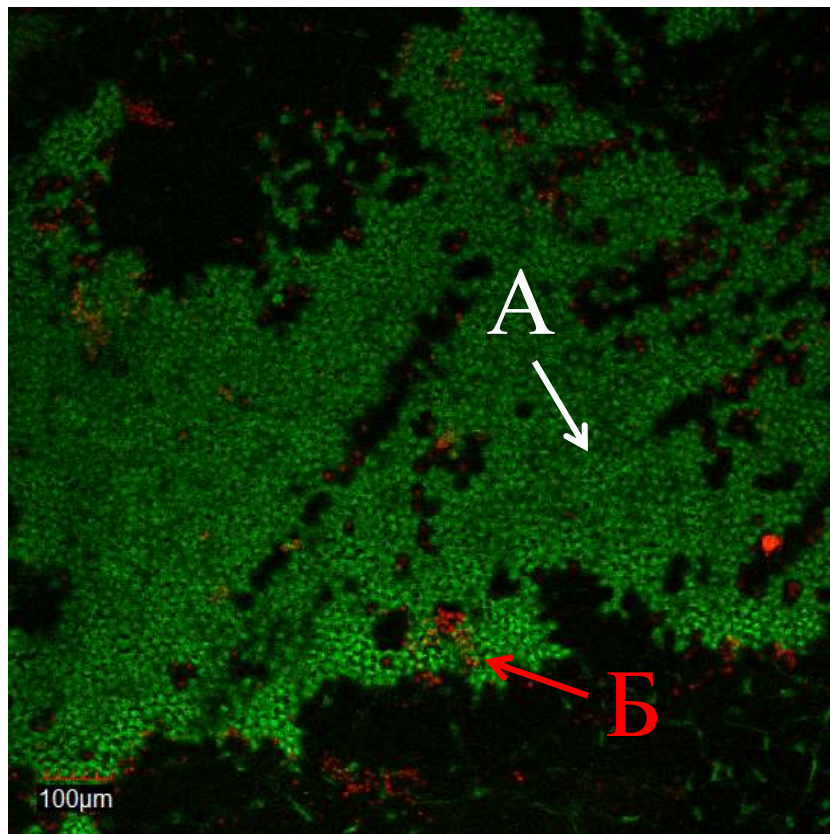
Рисунок 1 – Динамика изменения плотности эндотелиальных клеток трупных донорских роговиц в опытной и контрольной группах

К 6-м суткам плотность эндотелиальных клеток в опытной группе составила $2193,27 \pm 31,62$ клетки/мм², в контрольной группе – $2192,33 \pm 25,91$ клетки/мм². По результатам проведенного статистического анализа по окончании консервации отсутствовала достоверная разница между группами в плотности, площади, и показателе гексагональности эндотелиальных клеток. Снижение плотности эндотелиальных клеток за весь срок наблюдения в обеих группах не превышало 4%, что соответствует международным стандартам, предъявляемым к гипотермической консервации. Динамика изменения плотности эндотелиальных клеток роговицы свидетельствует о переносимости эндотелием (задним эпителием) консервации (до 6 суток) в рамках предлагаемой технологии.

3.3.2. Жизнеспособность клеток заднего эпителия

По прошествии 6 суток от начала консервации роговицы обеих групп выводились из эксперимента для изучения жизнеспособности, функциональной активности, фенотипической характеристики, и микростроения эндотелиальных клеток.

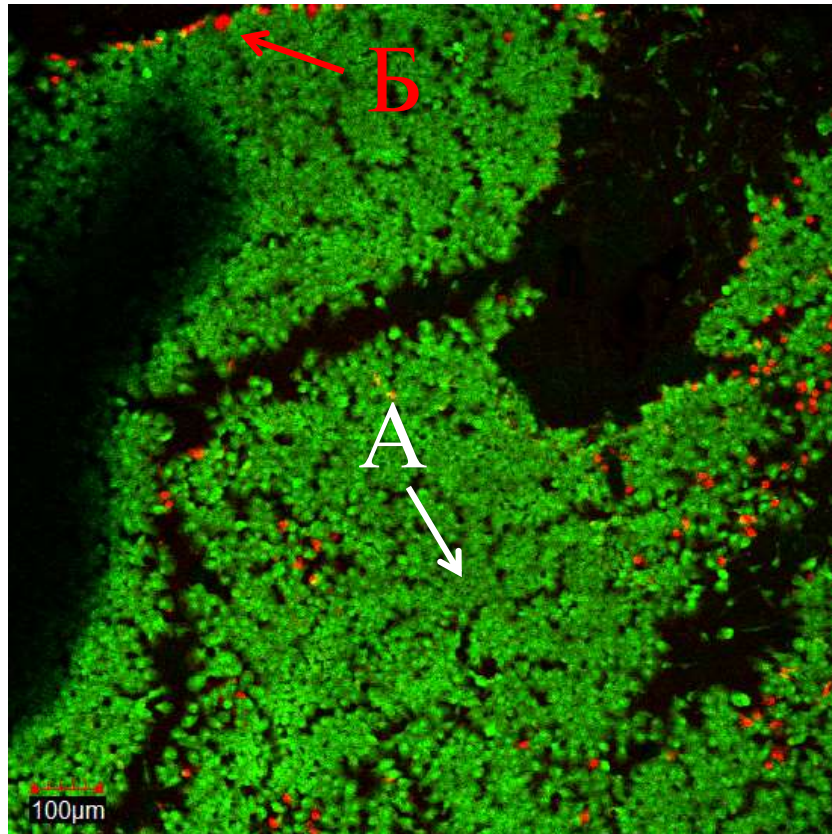
Оценка жизнеспособности заднего эпителия роговиц обеих групп проводилась в ходе иммуногистохимического исследования с использованием набора «Live and Dead». Полученные при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии изображения окрашенных клеток опытной группы представлены на рисунке 2, контрольной группы – на рисунке 3.



А – Живые клетки (белая стрелка);

Б – Мертвые клетки (красная стрелка)

Рисунок 2 – Иммуногистохимический анализ заднего эпителия роговицы опытной группы методом «Live and Dead». Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ув. 100х



А – Живые клетки (белая стрелка);

Б – Мертвые клетки (красная стрелка)

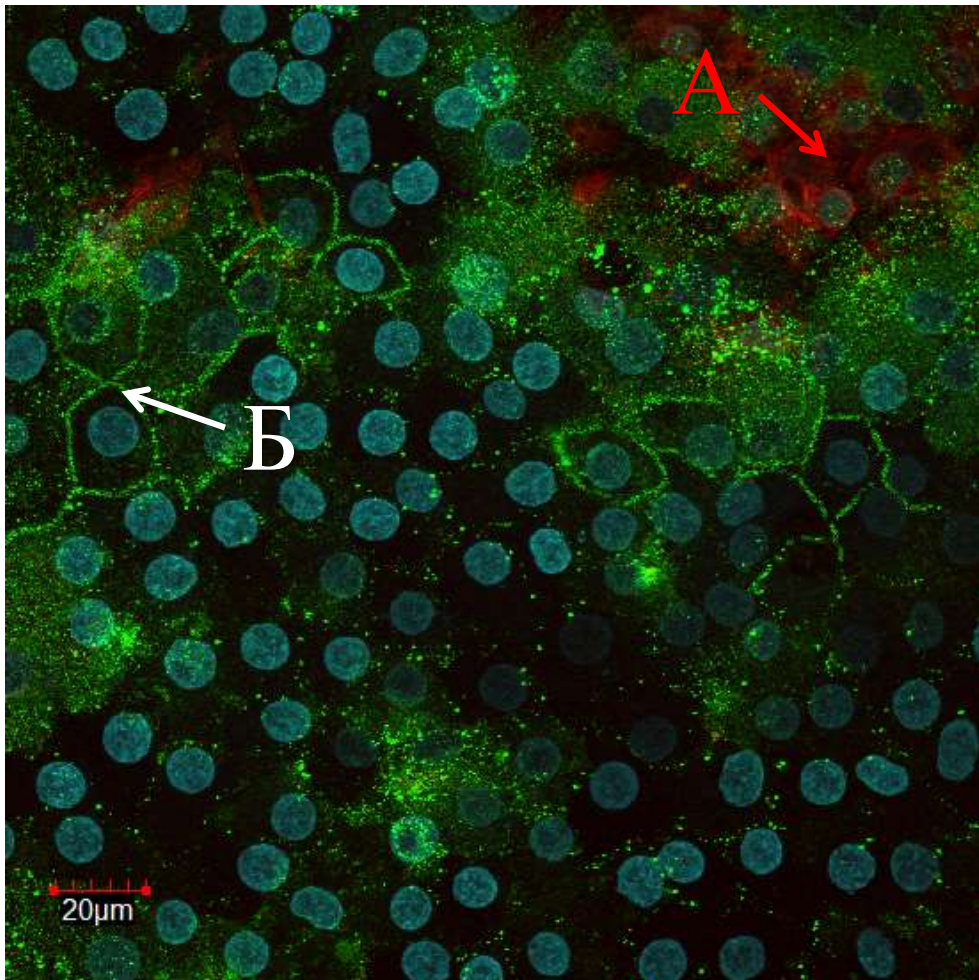
Рисунок 3 – Иммуногистохимический анализ заднего эпителия роговицы контрольной группы методом «Live and Dead». Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ув. 100х

В результате рутинного подсчета клеток на полученных изображениях было установлено, что среднее количество жизнеспособных клеток после 6 суточной консервации в опытной группе составило 97,23%, в контрольной группе – 98,05%. Статистически значимые отличия в количестве жизнеспособных клеток заднего эпителия между группами после 6 суточной консервации отсутствовали ($p > 0,05$).

3.3.3. Функциональная активность и фенотипическая характеристика клеток заднего эпителия

Оценка функциональной активности и фенотипической характеристики клеток заднего эпителия заключалась в изучении уровней экспрессии,

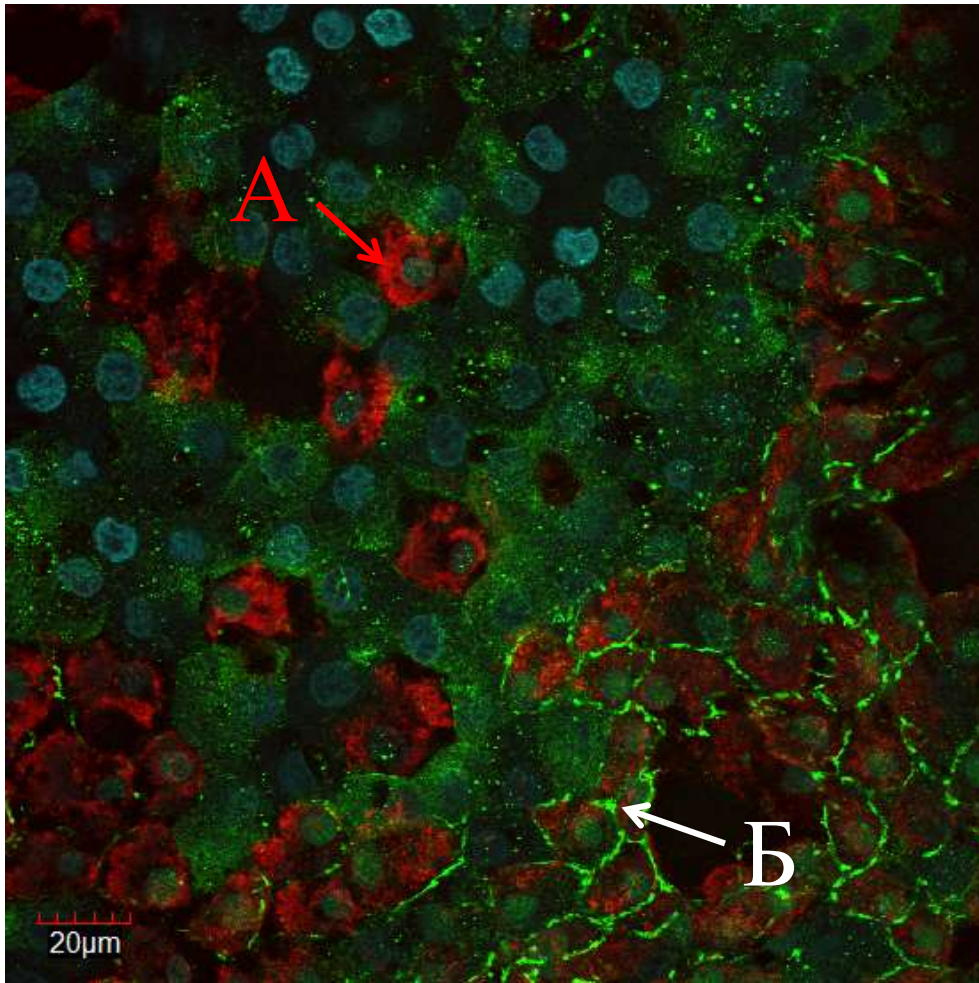
соответственно, Na^+/K^+ -АТФазы и ZO-1 в ходе иммуногистохимического исследования. Фермент Na^+/K^+ -АТФаза, характеризующий сохранность насосной (помпальной) функции заднего эпителия, был обнаружен во всех исследуемых роговицах обеих групп. Также маркер плотных межклеточных контактов ZO-1, характеризующий сохранность эпителиальной природы исследуемых клеток, был обнаружен во всех исследуемых роговицах обеих групп. Полученные при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии изображения экспрессии Na^+/K^+ -АТФазы и ZO-1 в опытной группе представлены на рисунке 4, в контрольной группе – на рисунке 5.



А – Экспрессия Na^+/K^+ -АТФазы (красная стрелка, **Alexa Fluor 594**);

Б – Экспрессия ZO-1 (белая стрелка, **Alexa Fluor 488**)

Рисунок 4 – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы опытной группы. *Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ув. 600x*



А – Экспрессия Na^+/K^+ -АТФазы (красная стрелка, **Alexa Fluor 594**);

Б – Экспрессия ZO-1 (белая стрелка, **Alexa Fluor 488**)

Рисунок 5 – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы контрольной группы. *Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ув. 600x*

В результате компьютерного анализа полученных изображений при помощи программного обеспечения «CellProfiler» было установлено, что среднее значение экспрессии Na^+/K^+ -АТФазы в опытной ($n = 15$) и контрольной ($n = 15$) группах составляло 0,0058 и 0,0056 относительных единиц, соответственно (рисунок 6). Статистически значимых отличий в уровнях экспрессии Na^+/K^+ -АТФазы между группами выявлено не было ($p > 0,05$). Также было установлено, что среднее значение экспрессии маркера плотных межклеточных контактов ZO-1 в опытной

($n = 15$) и контрольной ($n = 15$) группах составляло 0,0047 и 0,0045 относительных единиц, соответственно (рисунок 7). Статистически значимых отличий в экспрессии маркера плотных межклеточных контактов ZO-1 между группами также выявлено не было ($p > 0,05$).

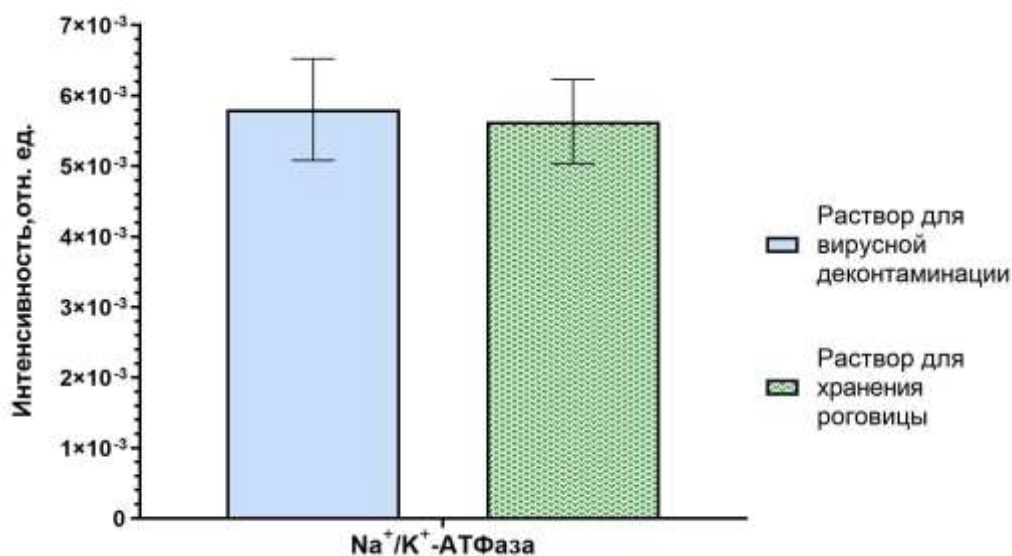


Рисунок 6 – Интенсивность экспрессии маркера насосной функции (Na^+/K^+ -АТФазы) в опытной (раствор для вирусной деконтаминации) и контрольной (раствор для хранения роговицы) группах

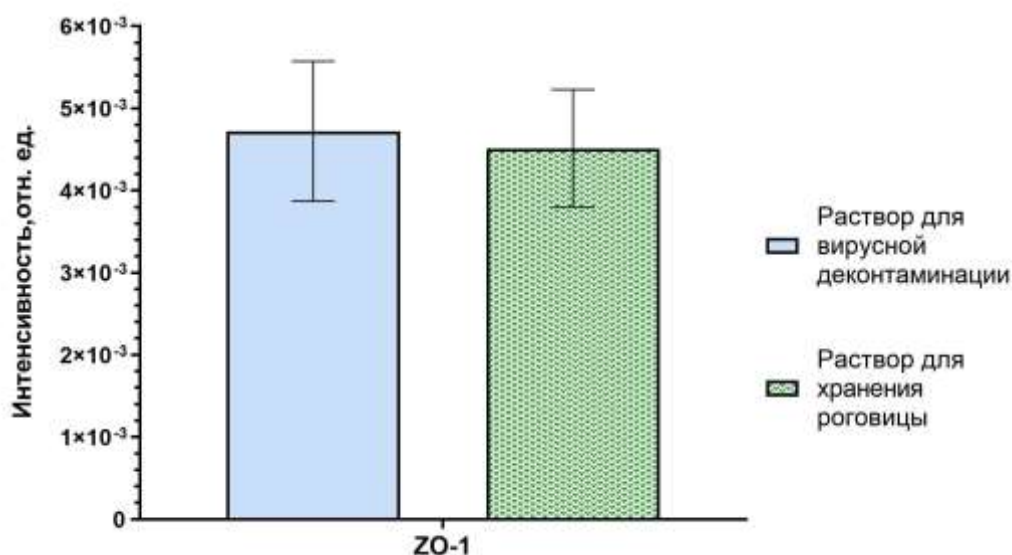


Рисунок 7 – Интенсивность экспрессии характерного маркера эпителиальных клеток ZO-1 в опытной (раствор для вирусной деконтаминации) и контрольной (раствор для хранения роговицы) группах

3.3.4. Микростроение клеток заднего эпителия

При анализе данных сканирующей электронной микроскопии после 6 суточной консервации было установлено, что межклеточные контакты и границы эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах оставались четко выраженными, клетки сохраняли правильную морфологическую гексагональную форму. Складки Десцеметовой мембраны в обеих группах были незначительными. Микростроение клеточного слоя заднего эпителия опытной и контрольной групп представлено на рисунках 8 и 9, соответственно.

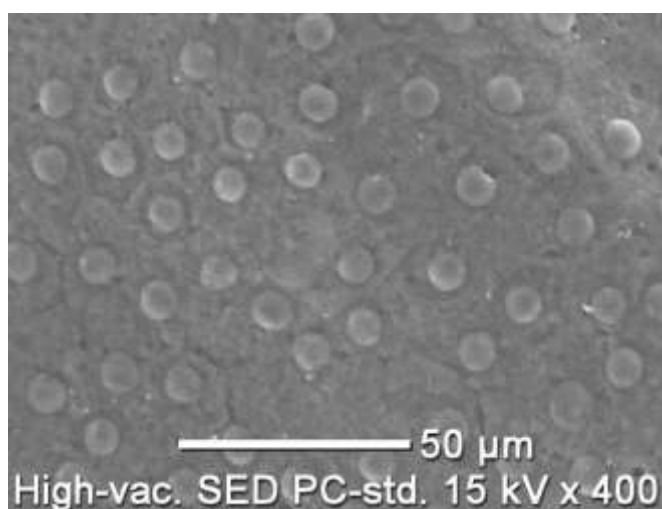


Рисунок 8 – Микростроение пласта эндотелиальных клеток опытной группы после 6 суточной консервации. Сканирующая электронная микроскопия, ув. 400x

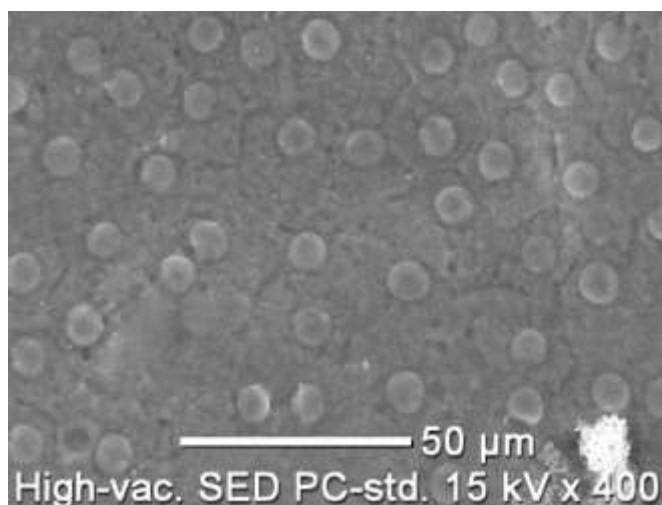


Рисунок 9 – Микростроение пласта эндотелиальных клеток контрольной группы после 6 суточной консервации. Сканирующая электронная микроскопия, ув. 400x

3.3.5. Результаты исследования стерильности консервационного раствора после вирусной деконтаминации

Образцы растворов опытной группы ($n = 15$) после вирусной деконтаминации исследовались на стерильность в автоматизированном бактериологическом анализаторе HB&L, а также стандартной методикой бактериологического посева. Отмечена сохранность стерильности всех образцов консервационных сред, что подтверждалось полным отсутствием кривых роста микроорганизмов (рисунок 10). После окончания исследования флаконы из анализатора Alifax направлялись на контрольный бактериологический посев по стандартной методике, которая также не выявила роста микроорганизмов, подтвердив сохранность стерильности опытных растворов.

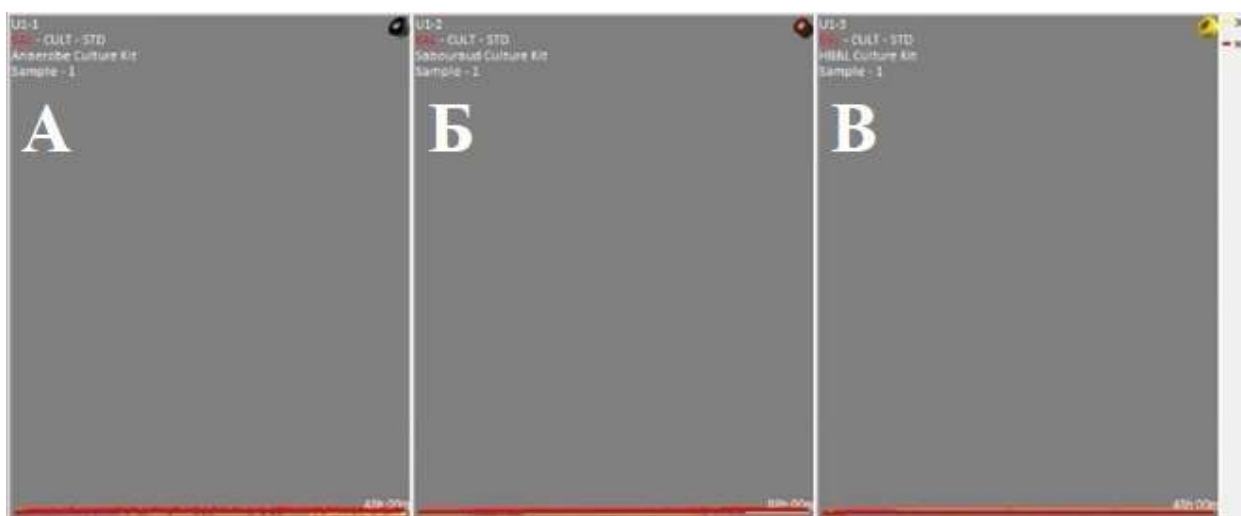


Рисунок 10 – Графическое изображение кривых роста микроорганизмов. Стерильность опытного раствора после вирусной деконтаминации при анализе на: А – анаэробную, Б – грибковую, В – аэробную инфекции

Таким образом, проведенный этап работы, заключающийся в изучении влияния разработанной технологии на эндотелиальные клетки, позволяет сделать вывод о безопасности условий консервации для эндотелия и сохранении консервационным раствором стерильности после вирусной деконтаминации.

3.4. Результаты оценки противовирусной эффективности разработанного раствора и предлагаемой технологии

Цитотоксическое действие и противовирусная эффективность разработанного раствора изучались на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в ходе экспериментального исследования *in vitro*.

3.4.1. Цитотоксическое действие

Полученные результаты оценки цитотоксического действия разработанного раствора, раствора для хранения роговицы и среды DMEM (отрицательный контроль), представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Цитотоксическое действие разработанного раствора для вирусной деконтаминации, раствора для хранения роговицы, среды DMEM на культуру клеточной линии Vero

Образец, №	Наименование образца	Результаты оценки методом световой микроскопии		Результаты оценки методом исключения витального красителя	
		ЦТД на клетки, %	ЦТД на клетки, %	количество живых клеток ¹	
				млн, М±m ²	%
1	Раствор для вирусной деконтаминации	0,0	0,3	2,04±0,30	99,7
2	Раствор для хранения роговицы	0,0	0,1	2,04±0,25	99,9
3	Среда DMEM (контроль) ³	0,0	0,0	2,05±0,20	100
Примечание	¹ Определено методом исключения витального красителя трипанового синего; ² средние значения по результатам трёх независимых повторов; ³ интактные клетки Vero – отрицательный контроль; ЦТД - цитотоксическое действие				

По полученным при помощи метода световой микроскопии данным о цитопатическом действии исследуемых образцов было установлено, что раствор для вирусной деконтаминации, а также базисный раствор для хранения роговицы, используемый в Глазных тканевых банках, не оказывали выраженного цитопатического действия на культуру клеток Vero в процессе культивирования. При этом жизнеспособность клеток Vero при культивировании с раствором для вирусной деконтаминации составила 99,7%, с раствором для консервации роговицы – 99,9%. Статистически значимые отличия в цитотоксическом действии между опытными растворами и средой DMEM (отрицательный контроль) отсутствовали ($p > 0,05$), между опытными растворами также отсутствовали статистически значимые отличия по данному критерию ($p > 0,05$).

3.4.2. Противовирусная эффективность

Результаты оценки противовирусной эффективности разработанного раствора были получены в ходе экспериментального исследования с использованием клеточной линии Vero и музейного штамма ВПГ-1. Противовирусная эффективность раствора для вирусной деконтаминации, раствора для хранения роговицы, среды DMEM изучена по терапевтической и профилактической схемам. Положительный контроль – инфицированные клетки Vero, к которым добавляли среду поддержки DMEM. Отрицательный контроль – неинфицированные клетки Vero, к которым добавляли среду поддержки DMEM. Результаты оценки противовирусной активности исследуемых образцов по терапевтической и профилактической схемам представлены в таблицах 21 и 22, соответственно.

Установлено, что раствор для вирусной деконтаминации обладает выраженной противовирусной эффективностью в отношении вируса простого герпеса 1 типа. Применение разработанного раствора по терапевтической и профилактической схемам приводило к статистически значимому снижению инфекционной активности тест-вируса на 3,1 lg и 3,4 lg, соответственно, по сравнению с контролем. Коэффициент ингибирования разработанного раствора

при использовании по терапевтической и профилактической схемам составил, соответственно, 56,4% и 56,7%. Титр вируса при культивировании по терапевтической и профилактической схемам составил, соответственно, $2,4 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$ и $2,6 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$. Схемы применения разработанного раствора статистически значимо не отличались между собой по уровню инфекционной активности, коэффициенту ингибирования и титру вируса ($p > 0,05$). Цитопатическое действие ВПГ-1 на клеточную линию Vero при использовании раствора для вирусной деконтаминации развивалось в среднем на 48 часов позже, чем в положительном контроле.

Таблица 21 – Влияние разработанного раствора для вирусной деконтаминации, раствора для хранения роговицы, среды DMEM на распространение инфекции, вызванной ВПГ-1, в культуре клеточной линии Vero при использовании по терапевтической схеме

Образец, №	Наименование образца	Уровень накопления вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$, $M \pm m^1$	Подавление репродукции вируса, Δ, \lg	Коэффициент ингибирования, %
1	Раствор для вирусной деконтаминации	$2,4 \pm 0,25^2$	3,1	56,4
2	Раствор для хранения роговицы	$5,2 \pm 0,2$	0,3	5,5
3	Среда DMEM + ВПГ-1 (положительный контроль)	$5,5 \pm 0,15$	-	-
4	Среда DMEM (отрицательный контроль)	-	-	-

Примечание. ¹ Средние значения по результатам трёх независимых повторов; ² достоверность по отношению к положительному контролю – инфицированные ВПГ-1 клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM, $p < 0,05$.

Таблица 22 – Влияние разработанного раствора для вирусной деконтаминации, раствора для хранения роговицы, среды DMEM на распространение инфекции, вызванной ВПГ-1, в культуре клеточной линии Vero при использовании по профилактической схеме

Образец, №	Наименование образца	Уровень накопления вируса, lg ТЦД ₅₀ /0,1 мл, M±m ¹	Подавление репродукции вируса, Δ, lg	Коэффициент ингибирования, %
1	Раствор для вирусной деконтаминации	2,6±0,25 ²	3,4	56,7
2	Раствор для хранения роговицы	5,5±0,3	0,5	8,3
3	Среда DMEM + ВПГ-1 (положительный контроль)	6,0±0,25	-	-
4	Среда DMEM (отрицательный контроль)	-	-	-

Примечание. ¹ Средние значения по результатам трёх независимых повторов; ² достоверность по отношению к положительному контролю – инфицированные ВПГ-1 клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM, p < 0,05.

Определено, что раствор для хранения роговицы, используемый в Глазных тканевых банках для гипотермической консервации донорских роговиц, не обладает противовирусными свойствами в отношении вируса простого герпеса 1 типа.

При использовании раствора для хранения роговицы по терапевтической и профилактической схемам: инфекционная активность составила 0,3 lg и 0,5 lg, соответственно; коэффициент ингибирования составил 5,5% и 8,3%, соответственно; титр вируса составил 5,2 ± 0,2 lg ТЦД₅₀/0,1 мл и 5,5 ± 0,3 lg

ТЦД₅₀/0,1 мл, соответственно, и не имел статистически значимых отличий от питательной среды DMEM ($6,0 \pm 0,25 \lg$ ТЦД₅₀/0,1 мл и $5,5 \pm 0,15 \lg$ ТЦД₅₀/0,1 мл, соответственно, $p > 0,05$). Также базовый раствор для хранения роговицы и среда DMEM не влияли на время развития цитопатического действия, вызванного штаммом тест-вируса (ВПГ-1).

По результатам сравнительного анализа противовирусной активности раствора для вирусной деконтаминации и раствора для хранения роговицы было установлено, что инфекционная активность и титр накопления ВПГ-1 были статистически значимо меньше на фоне применения разработанного раствора для вирусной деконтаминации по сравнению с раствором для хранения роговицы ($p < 0,05$). Также коэффициент вирусного ингибирования на фоне применения раствора для вирусной деконтаминации был статистически значимо выше по сравнению с аналогичным параметром на фоне применения раствора для хранения роговицы ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенный на данном этапе работы анализ консервационных растворов и среды DMEM позволил сформировать объективное представление о противовирусной активности исследуемых образцов.

При этом совокупность исследуемых критериев (инфекционная активность, титр накопления, коэффициент ингибирования ВПГ-1) рекомендуются Фармакологическим государственным комитетом Российской Федерации для оценки противовирусных свойств, и позволяет наиболее полно характеризовать протекающую экспериментальную герпесвирусную инфекцию.

Также клеточная линия Vero, использованная в данном разделе работы, регулярно применяется в ходе вирусологических исследований герпесвирусных инфекций, поскольку обладает 100% специфичностью в отношении вируса простого герпеса 1 типа.

3.5. Результаты определения уровней синтезированных эндогенных интерферонов клетками донорской роговицы

На данном этапе исследования в эксперименте *in vitro* оценивалась способность клеточных культур кератоцитов, фибробластов, а также ткани роговицы к продукции собственного интерферона- β во время стимуляции индуктором интерферона.

Для выполнения поставленной задачи проводилась оценка количества синтезированных эндогенных интерферонов клетками, выделенными из роговицы человека (кератоцитами и фибробластами с верификацией фенотипа) при стимуляции индукторами интерферона, после чего оценивалось количество выработанных интерферонов трупными донорскими роговицами после вирусной деконтаминации в разработанном консервационном растворе.

3.5.1. Полученные клеточные культуры кератоцитов и фибробластов

В данном разделе работы из образцов стромы трупных донорских роговиц были получены кератоциты и культивированы фибробласты для дальнейшего дифференциального подхода, который учитывал особенности рецепторного аппарата данных клеток, что было необходимо для понимания механизмов естественной противовирусной защиты роговицы от инвазии и распространения вируса простого герпеса 1 типа. Морфология полученных клеточных культур кератоцитов представлена на рисунке 11, фибробластов – на рисунке 12.

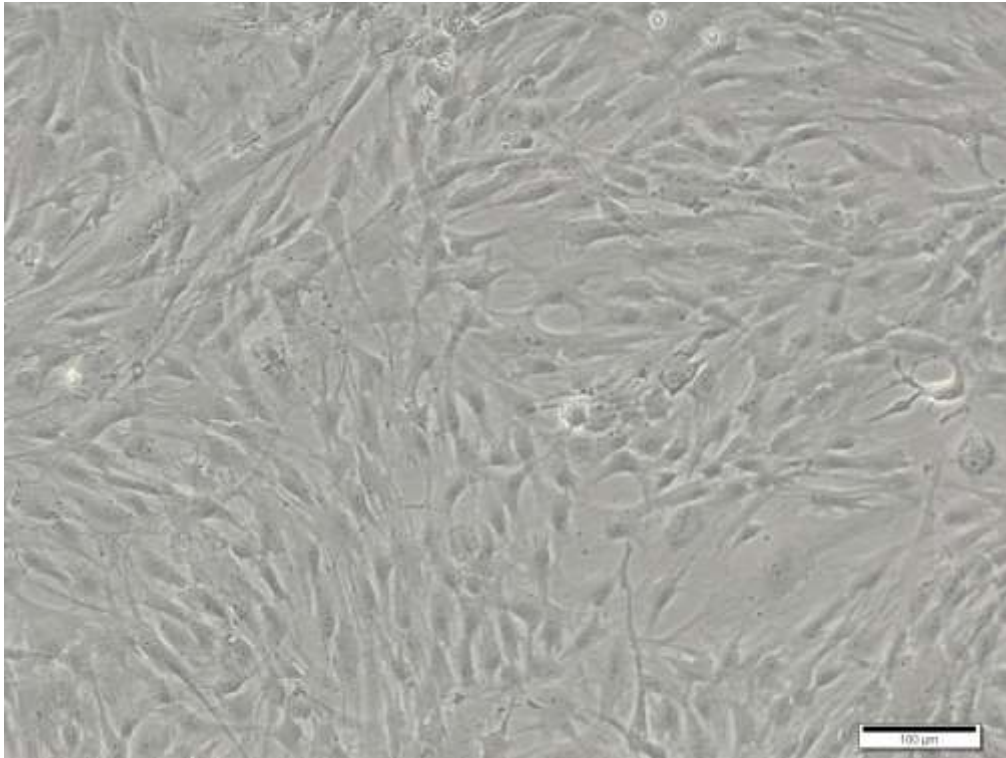


Рисунок 11 – Морфология клеточной культуры кератоцитов.
Световая фазово-контрастная микроскопия ув. 100х



Рисунок 12 – Морфология клеточной культуры фибробластов.
Световая фазово-контрастная микроскопия ув. 100х

В качестве индукторов интерферона для стимуляции культивированных клеток роговицы использовались фармакологические препараты Циклоферон и Полудан, относящиеся к синтетическим индукторам интерферонов.

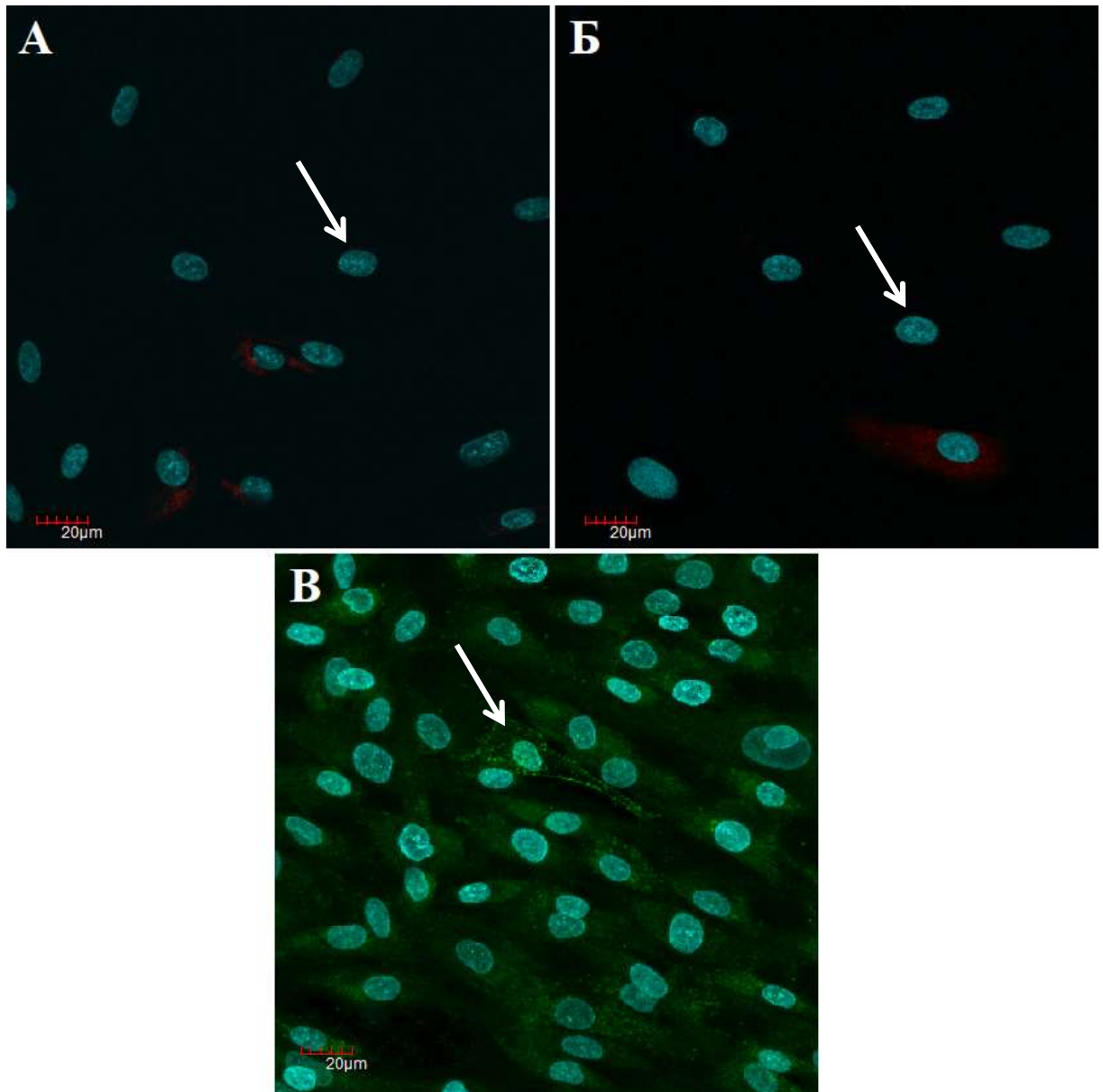
При этом Полудан относится к классу полимерных двуцепочечных индукторов интерферонов, Циклоферон – к классу низкомолекулярных индукторов интерферонов (акриданоны).

3.5.2. Результаты иммуноцитохимического анализа

По окончании клеточного культивирования фенотип кератоцитов и фибробластов роговицы был верифицирован при помощи иммуноцитохимического анализа. В данном исследовании применялась техника клеточного культивирования, используемая в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, что позволило выделить клетки роговицы с минимальным механическим и ферментативным воздействием на ткань. Минимальное воздействие на ткань роговицы способствовало сохранению нативного фенотипа клеток в процессе их выделения и дальнейшего культивирования.

Сохранность фенотипа оценивалась по экспрессии характерных белков-маркеров. Так, известно, что клеточные культуры кератоцитов продуцируют характерный белок – кератокан, фибробласты – α -гладкомышечный актин (белок сократительной функции) и виментин.

В результате проведенного иммуноцитохимического анализа полученных клеточных культур было установлено, что кератоциты сохраняли нативный фенотип: наблюдалась экспрессия характерного маркера кератоцитов – кератокана при отсутствии либо слабой экспрессии α -гладкомышечного актина и виментина (рисунок 13). В то же время в культуре фибробластов определялась экспрессия характерных маркеров фибробластов – α -гладкомышечного актина и виментина, при отсутствии либо слабой экспрессии кератокана (рисунок 14).



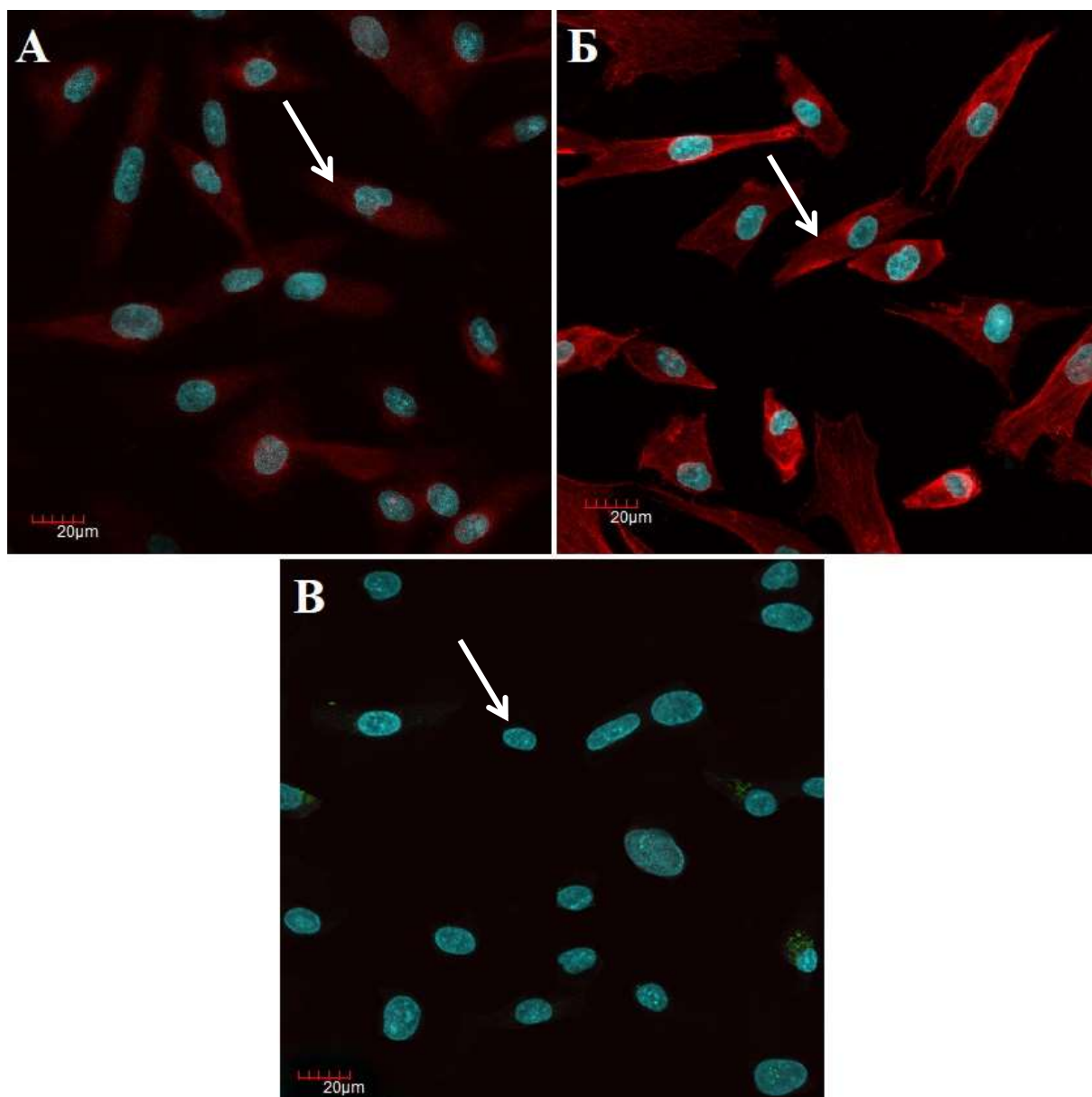
А – Отсутствие экспрессии характерного маркера фибробластов α -гладкомышечного актина (отмечено стрелкой, **Alexa Fluor 594**);

Б – Отсутствие экспрессии характерного маркера фибробластов виментина (отмечено стрелкой, **Alexa Fluor 594**);

В – Экспрессия характерного маркера кератоцитов кератокана (отмечено стрелкой, **Alexa Fluor 488**)

Рисунок 13 – Иммуноцитохимический анализ культуры кератоцитов.

Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра докрашены красителем бис-бензими́д (Hoechst 33258) ув. 600x



А – Экспрессия характерного маркера фибробластов
 α-гладкомышечного актина (отмечено стрелкой, **Alexa Fluor 594**);

Б – Экспрессия характерного маркера фибробластов
 виментина (отмечено стрелкой, **Alexa Fluor 594**);

В – Отсутствие экспрессии характерного маркера кератоцитов
 кератокана (отмечено стрелкой, **Alexa Fluor 488**)

Рисунок 14 – Иммуноцитохимический анализ культуры фибробластов.

Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая

конфокальная микроскопия, ядра докрашены красителем

бис-бензими́д (Hoechst 33258) ув. 600х

По результатам проведенного объективного анализа полученных изображений при помощи программного обеспечения «CellProfiler» было установлено, что среднее значение экспрессии α -гладкомышечного актина, виментина и кератокана в клеточных культурах кератоцитов составило, соответственно: 0,011, 0,027 и 0,118 отн. ед.

Также было установлено, что среднее значение экспрессии α -гладкомышечного актина, виментина и кератокана в клеточных культурах фибробластов составило, соответственно: 0,126, 0,117 и 0,017 отн. ед. Количество экспрессируемого кератоцитами кератокана было статистически значимо выше, чем экспрессия данного белка фибробластами ($p < 0,05$). При этом в клеточных культурах фибробластов уровни экспрессии α -гладкомышечного актина и виментина были статистически значимо выше уровней экспрессии данных маркеров в клеточной культуре кератоцитов ($p < 0,05$).

Однако при статистически значимых отличиях между кератоцитами и фибробластами в уровнях экспрессии характерных маркеров немаловажным остается факт наличия незначительной экспрессии α -гладкомышечного актина и виментина в клеточной культуре кератоцитов, что говорит о переходе части клеток (около 10%) в фибробластный тип.

В то же время в клеточной культуре фибробластов наблюдалась незначительная экспрессия кератокана, что в свою очередь говорит о переходе или сохранении частью клеток нативного фенотипа кератоцитов.

Графические изображения уровней экспрессии характерных маркеров кератоцитов и фибробластов представлены, соответственно, на рисунках 15 и 16.

По результатам проведенного иммуноцитохимического анализа, был подтвержден фенотип полученных клеточных культур.

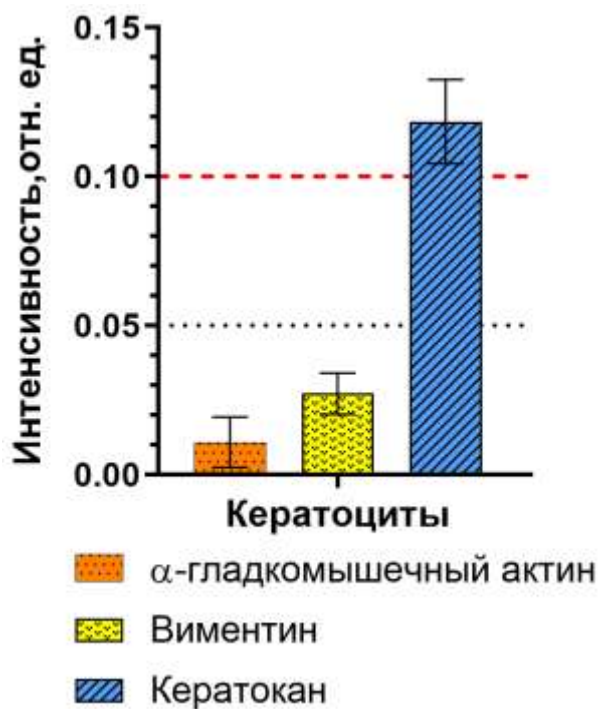


Рисунок 15 – Уровни экспрессии α -гладкомышечного актина, виментина, кератокана в полученных культурах кератоцитов. Красной пунктирной линией обозначена граница выраженной экспрессии, черной – слабой экспрессии

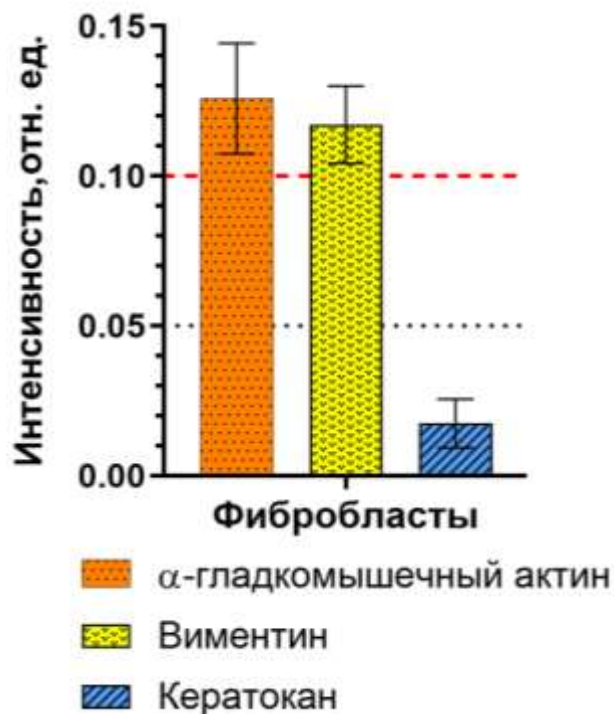


Рисунок 16 – Уровни экспрессии α -гладкомышечного актина, виментина, кератокана в полученных культурах фибробластов. Красной пунктирной линией обозначена граница выраженной экспрессии, черной – слабой экспрессии

3.5.3. Результаты иммуноферментного анализа супернатантов культуры кератоцитов и фибробластов стромы роговицы человека

Проведение индукции клеточных культур кератоцитов в течение суток ростовой средой с Циклофероном в концентрации 1 мг / 100 мл и Полуданом в концентрации 1000 ЕД / 100 мл привело к выработке эндогенных интерферонов 1 типа (ИФН- α и ИФН- β).

Результаты количественного иммуноферментного анализа супернатантов культуры кератоцитов после суточной стимуляции индукторами интерферонов представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Количество интерферона- α и интерферона- β в ростовой среде после суточного культивирования культуры кератоцитов с индукторами интерферонов

Образец, №	Кератоциты + Ростовая среда + Циклоферон, 1 мг/100 мл		Кератоциты + Ростовая среда + Полудан, 1000 ЕД/100 мл	
	ИФН- α , пг/мл	ИФН- β , пг/мл	ИФН- α , пг/мл	ИФН- β , пг/мл
1	2,91	7,47	1,24	5,95
2	6,89	8,94	2,23	3,42
3	12,24	15,05	7,21	9,7
4	5,22	11,5	2,32	10,48
5	3,12	7,03	4,87	8,32
6	4,55	3,47	6,73	9,03
7	7,83	9,86	11,37	16,19
8	10,78	12,64	2,81	3,74
9	7,29	8,05	2,76	4,37
10	5,74	7,61	9,63	8,92
11	2,51	2,67	2,1	3,67
12	7,62	10,78	6,68	7,39
13	9,1	9,94	1,34	3,06
14	8,38	4,68	3,67	5,6
15	6,51	7,89	1,42	6,63
М \pm σ	6,71 \pm 2,19	8,51 \pm 2,56	4,43 \pm 2,66	7,10 \pm 2,71

Стимуляция клеточных культур фибробластов в течение суток ростовой средой с Циклофероном в концентрации 1 мг / 100 мл и Полуданом в концентрации 1000 ЕД / 100 мл привела к выработке эндогенных интерферонов 1 типа (интерферона- α и интерферона- β). Результаты количественного иммуноферментного анализа супернатантов культуры фибробластов после суточной стимуляции индукторами интерферонов представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Количество интерферона- α и интерферона- β в ростовой среде после суточного культивирования культуры фибробластов с индукторами интерферонов

Образец, №	Фибробласты + Ростовая среда + Циклоферон, 1 мг/100 мл		Фибробласты + Ростовая среда + Полудан, 1000 ЕД/100 мл	
	ИФН- α , пг/мл	ИФН- β , пг/мл	ИФН- α , пг/мл	ИФН- β , пг/мл
1	8,76	43,4	6,88	42,94
2	9,53	53,28	7,69	55,83
3	15,39	59,37	15,74	64,08
4	9,82	44,6	3,73	38,83
5	3,9	41,87	5,16	39,93
6	11,42	45,5	3,21	54,3
7	9,43	39,18	7,37	35,4
8	19,79	61,71	18,25	65,49
9	12,87	51,31	6,43	45,12
10	9,42	50,53	4,7	55,14
11	3,31	23,65	2,87	31,61
12	16,55	41,22	14,36	43,41
13	14,21	64,63	8,08	50,32
14	12,23	45,82	4,46	45,81
15	9,28	31,29	5,06	64,6
М \pm σ	11,06 \pm 3,34	46,49 \pm 8,25	7,60 \pm 3,48	48,85 \pm 9,04

В результате проведенного сравнительного статистического анализа было отмечено, что уровни синтезированного интерферона- α и интерферона- β имели отличия при индукции кератоцитов и фибробластов. Так, количество синтезированного интерферона- α кератоцитами и фибробластами при индукции

Циклофероном составило, соответственно, $6,71 \pm 2,19$ и $11,06 \pm 3,34$ пг/мл. При этом уровни интерферона- α после индукции Циклофероном фибробластов оказались статистически значимо выше, чем при аналогичной стимуляции кератоцитов ($p < 0,05$). Количество синтезированного интерферона- β при индукции Циклофероном клеточной культуры фибробластов было статистически значимо выше, чем при аналогичной стимуляции кератоцитов и составило, соответственно, $46,49 \pm 8,25$ и $8,51 \pm 2,56$ пг/мл ($p < 0,05$).

Уровни эндогенного интерферона- α после индукции Полуданом клеточной культуры фибробластов, были статистически значимо выше, чем при стимуляции данным препаратом клеточной культуры кератоцитов, и составили, соответственно, $7,60 \pm 3,48$ и $4,43 \pm 2,66$ пг/мл ($p < 0,05$). Количество синтезированного интерферона- β на фоне индукции Полуданом клеточной культуры фибробластов было статистически значимо выше, чем при стимуляции данным индуктором интерферона клеточной культуры кератоцитов, и составили, соответственно, $48,85 \pm 9,04$ и $7,10 \pm 2,71$ пг/мл ($p < 0,05$).

Клеточная культура фибробластов демонстрирует способность к продукции значительно большего количества интерферона- α и интерферона- β , чем клеточная культура кератоцитов в идентичных условиях ($p < 0,05$).

При стимуляции различными препаратами фенотипически однородных клеточных популяций не было обнаружено статистически значимой разницы в уровнях синтезированного эндогенного интерферона- β ($p > 0,05$). Количество синтезированного интерферона- α на фоне индукции Циклофероном клеточных культур кератоцитов и фибробластов было статистически значимо выше, чем при аналогичной стимуляции данных клеточных культур Полуданом ($p < 0,05$).

Полученные в ходе иммуноферментного анализа данные полностью соответствуют функциям клеток в рамках их фенотипа. Так, хорошо известно, что клеточные культуры фибробластов преимущественно вырабатывают эндогенный интерферон- β (который часто именуется фибробластным), что было подтверждено в ходе данного исследования.

3.5.4. Результаты иммуноферментного анализа образцов консервационных растворов

Полученные в ходе третьего этапа исследования образцы опытных (раствор для вирусной деконтаминации) и контрольных (раствор для хранения роговицы) консервационных растворов изучались методом иммуноферментного анализа для определения содержания в составе интерферонов.

Полученные результаты количественной оценки содержания интерферонов в консервационном растворе после вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Количество интерферонов 1 типа (интерферона- α и интерферона- β) в образцах растворов для вирусной деконтаминации после консервации

Образец, №	Раствор для вирусной деконтаминации	
	Интерферон- α , пг/мл	Интерферон- β , пг/мл
1	15,4	23,94
2	8,77	18,77
3	16,12	21,36
4	9,61	12,86
5	23,14	37,4
6	12,31	25,38
7	10,94	21,41
8	21,45	38,09
9	16,51	28,3
10	19,12	26,31
11	7,19	14,68
12	16,37	34,9
13	11,12	17,55
14	16,26	21,83
15	8,05	14,91
$M \pm \sigma$	$14,16 \pm 4,15$	$23,85 \pm 6,32$

В образцах консервационных растворов для вирусной деконтаминации среднее содержание интерферона- α составило $14,16 \pm 4,15$ пг/мл, интерферона- β – $23,85 \pm 6,32$ пг/мл. При этом в образцах растворов для хранения роговицы после консервации по стандартной методике интерфероны 1 типа (интерферон- α и интерферон- β) не определялись.

Таким образом, разработанная рецептура консервационного раствора для вирусной деконтаминации за счет входящего в состав индуктора интерферона вызывает активацию системы врожденного иммунитета в клетках роговицы, что выражается в запуске TLR-зависимого пути синтеза интерферона- α и интерферона- β , о чем свидетельствуют данные, полученные в ходе иммуноферментного анализа.

3.6. Результаты оценки противовирусной эффективности предложенной технологии при помощи полимеразной цепной реакции на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов и трупных донорских роговиц

На данном этапе исследования на основании данных полимеразной цепной реакции оценивалась противовирусная эффективность предлагаемой технологии. Для этого вначале вирусная деконтаминация проводилась на патологически измененных роговичных дисках реципиентов, после чего – на трупных донорских роговицах в глазном тканевом банке.

3.6.1. Результаты оценки противовирусной эффективности предлагаемой технологии на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов

При помощи полимеразной цепной реакции оценивалось количество копий ВПГ-1 во фрагментах роговичных дисков после вирусной деконтаминации по предлагаемой технологии (опытная группа) и консервации по стандартной технологии в растворе для хранения роговицы (контрольная группа).

Концентрация выделенной ДНК лежала в диапазоне от 40 до 100 нг/мкл, A260/280 составляла от 1,8 до 1,87, A260/230 – от 1,5 до 1,9. Анализ целостности геномной ДНК методом капиллярного электрофореза показал, что длина фрагментов ДНК составляла от 6 до 10 килобаз, что говорило об её высоком качестве. Результаты выражали в количестве копий вирусной ДНК на мл образца и в количестве копий вирусной ДНК на клетку, исходя из количества выделенной ДНК в образцах ПЦР и принимая массу одной копии геномной ДНК человека равной 6,4 пг. Порог чувствительности реакционной смеси для определения ВПГ-1 лежал в линейном диапазоне от 1000 копий до 5×10^5 копий микроорганизма, содержащихся в 1 мл клинического образца, помещенного в транспортный раствор. Полученные данные представлены в таблице 26 и на рисунке 17.

Таблица 26 – Результаты количественного ПЦР-исследования

Роговичный диск, №	Опытный фрагмент		Контрольный фрагмент	
	Вирусные копии, на мл	Вирусные копии, на клетку	Вирусные копии, на мл	Вирусные копии, на клетку
1	$4,85 \cdot 10^3$	$9,57 \cdot 10^{-03}$	$6,04 \cdot 10^4$	$9,61 \cdot 10^{-02}$
2	$4,21 \cdot 10^3$	$7,68 \cdot 10^{-03}$	$4,88 \cdot 10^4$	$7,60 \cdot 10^{-02}$
3	$4,77 \cdot 10^3$	$1,04 \cdot 10^{-02}$	$7,10 \cdot 10^4$	$1,55 \cdot 10^{-01}$
4	$3,17 \cdot 10^3$	$4,39 \cdot 10^{-03}$	$7,98 \cdot 10^4$	$1,29 \cdot 10^{-01}$
5	$8,59 \cdot 10^3$	$1,92 \cdot 10^{-02}$	$1,05 \cdot 10^4$	$2,48 \cdot 10^{-02}$
6	$7,30 \cdot 10^3$	$5,37 \cdot 10^{-03}$	$5,55 \cdot 10^4$	$3,83 \cdot 10^{-02}$
7	$6,67 \cdot 10^3$	$7,86 \cdot 10^{-03}$	$7,25 \cdot 10^4$	$9,36 \cdot 10^{-02}$
8	$2,45 \cdot 10^3$	$1,44 \cdot 10^{-03}$	$3,80 \cdot 10^5$	$2,57 \cdot 10^{-01}$
9	$4,86 \cdot 10^3$	$9,09 \cdot 10^{-03}$	$2,36 \cdot 10^5$	$5,16 \cdot 10^{-01}$
10	$4,32 \cdot 10^3$	$6,43 \cdot 10^{-03}$	$1,28 \cdot 10^5$	$1,98 \cdot 10^{-01}$
11	$1,15 \cdot 10^4$	$2,22 \cdot 10^{-02}$	$1,24 \cdot 10^5$	$2,58 \cdot 10^{-01}$
12	$3,41 \cdot 10^3$	$7,55 \cdot 10^{-03}$	$8,50 \cdot 10^3$	$2,14 \cdot 10^{-02}$
$M \pm \sigma$	$5,50 \cdot 10^3$ $\pm 2,0 \cdot 10^3$	$7,60 \cdot 10^{-03}$ $\pm 3,03 \cdot 10^{-03}$	$1,06 \cdot 10^5$ $\pm 7,38 \cdot 10^4$	$1,56 \cdot 10^{-01}$ $\pm 1,01 \cdot 10^{-01}$

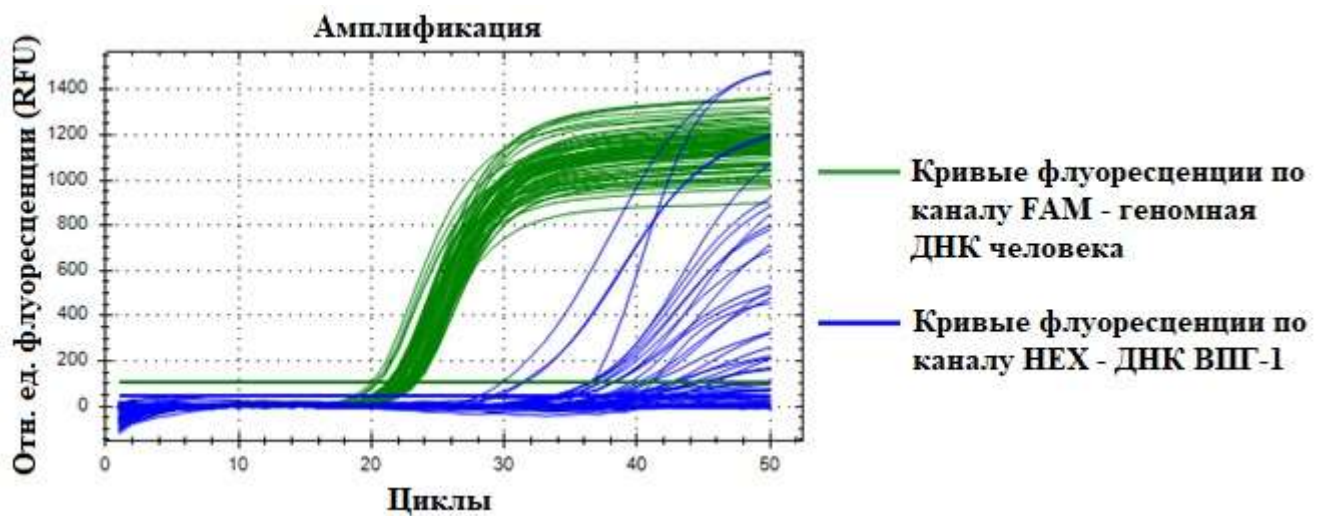


Рисунок 17 – Кривые флуоресценции, полученные в ходе ПЦР

В результате сравнительного статистического анализа полученных данных было установлено, что количество копий ВПГ-1 в образцах опытной группы после суточной нормотермической консервации по предлагаемой технологии было статистически достоверно меньше, чем в образцах контрольной группы после суточной гипотермической консервации по стандартной технологии в растворе для хранения роговицы ($p < 0,05$).

3.6.2. Результаты оценки противовирусной эффективности предлагаемой технологии на трупных донорских роговицах в глазном тканевом банке

В заключительном фрагменте работы при помощи полимеразной цепной реакции оценивалась противовирусная эффективность предлагаемой технологии на примере трупных донорских роговиц.

Отбор роговиц осуществлялся на основании ПЦР-анализа эпителиальных соскобов. Для данного исследования отбирались роговицы, в эпителии которых был обнаружен ВПГ-1. Образцы эпителия были получены в ходе стандартного процесса выкраивания роговицы в глазном тканевом банке. Заготовленные роговицы консервировались в течение суток в растворе для хранения роговицы, после чего разделялись на группы. В опытную группу входили роговицы, которые, согласно предлагаемой технологии, подвергали суточной вирусной деконтаминации в разработанном растворе. В контрольную группу вошли парные роговицы, которые продолжали консервировать по стандартной технологии в течение суток. Спустя 24 часа роговицы обеих групп выводились из эксперимента для ПЦР-анализа на содержание ВПГ-1.

Результаты ПЦР-исследования ткани донорских роговиц приведены в таблице 27 и на рисунке 18.

Таблица 27 – Результаты количественного ПЦР-исследования ткани трупных донорских роговиц на присутствие ДНК ВПГ-1 после консервации в опытной и контрольной группах

Роговица, №	ДНК ВПГ-1, опытная группа (технология вирусной деконтаминации)		ДНК ВПГ-1, контрольная группа (стандартная технология консервации)	
	Вирусные копии, на мл	Вирусные копии, на клетку	Вирусные копии, на мл	Вирусные копии, на клетку
1	$9,59 \cdot 10^2$	$2,26 \cdot 10^{-04}$	$1,71 \cdot 10^3$	$4,63 \cdot 10^{-03}$
2	$1,46 \cdot 10^3$	$5,27 \cdot 10^{-04}$	$1,83 \cdot 10^3$	$6,62 \cdot 10^{-03}$
3	$1,87 \cdot 10^3$	$6,21 \cdot 10^{-04}$	$3,16 \cdot 10^3$	$9,55 \cdot 10^{-03}$
4	$1,45 \cdot 10^3$	$1,37 \cdot 10^{-03}$	$1,47 \cdot 10^3$	$1,47 \cdot 10^{-03}$
5	$1,55 \cdot 10^3$	$1,13 \cdot 10^{-03}$	$5,33 \cdot 10^3$	$6,75 \cdot 10^{-03}$
6	$1,68 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^{-03}$	$3,53 \cdot 10^3$	$3,84 \cdot 10^{-03}$
7	$3,17 \cdot 10^3$	$7,54 \cdot 10^{-03}$	$5,61 \cdot 10^3$	$1,23 \cdot 10^{-02}$
8	$1,40 \cdot 10^3$	$1,86 \cdot 10^{-03}$	$1,97 \cdot 10^3$	$2,34 \cdot 10^{-03}$
9	$9,78 \cdot 10^2$	$8,28 \cdot 10^{-04}$	$1,90 \cdot 10^3$	$1,77 \cdot 10^{-03}$
$M \pm \sigma$	$1,61 \cdot 10^3 \pm 4,18 \cdot 10^2$	$1,74 \cdot 10^{-03} \pm 1,31 \cdot 10^{-03}$	$2,95 \cdot 10^3 \pm 1,30 \cdot 10^3$	$5,47 \cdot 10^{-03} \pm 2,96 \cdot 10^{-03}$

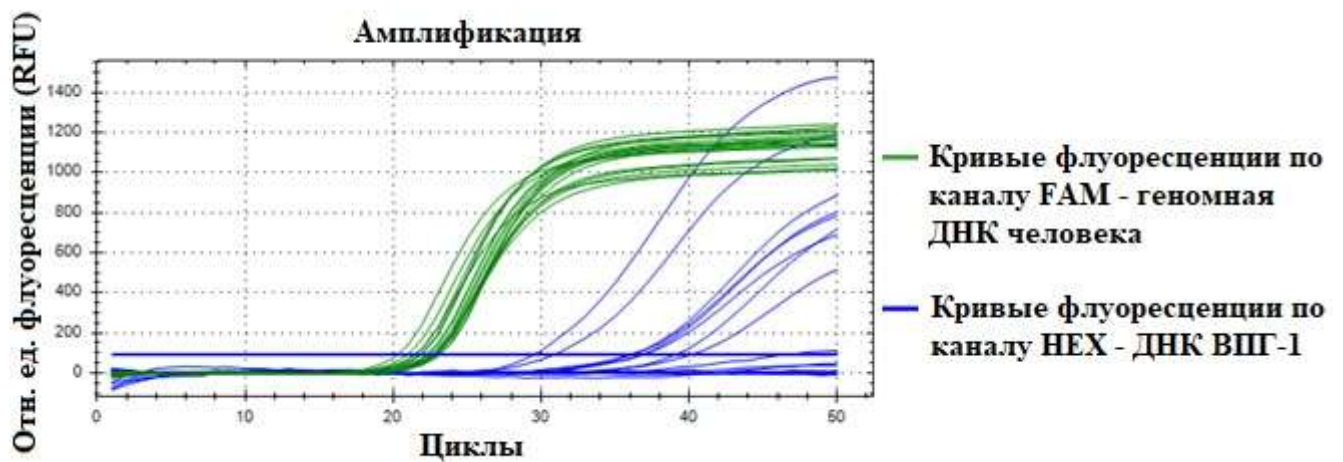


Рисунок 18 – Кривые флуоресценции, полученные в ходе ПЦР

По результатам проведенного ПЦР-исследования было установлено, что эпителий всех опытных и контрольных роговиц содержал вирус простого герпеса 1 типа перед началом консервации. Также было установлено, что все роговицы опытной группы после суточной консервации по предлагаемой технологии в растворе для вирусной деконтаминации содержали достоверно меньшее количество ДНК вируса простого герпеса 1 типа, чем роговицы контрольной группы, консервированные по стандартной технологии ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что раствор для вирусной деконтаминации роговицы в рамках предлагаемой технологии консервации препятствует размножению вируса простого герпеса 1 типа, приводит к деструкции вирусных частиц, повреждая их ДНК, что подтверждается данными ПЦР-исследования. На основании анализа данных ПЦР-исследования показано, что раствор для вирусной деконтаминации обладает противовирусными свойствами в отношении вируса простого герпеса 1 типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поражения роговицы являются одной из ведущих причин потери зрения людей во всем мире. При этом, среди инфекционных причин поражения роговицы на первом месте находятся вирусы группы герпеса [20]. Семейство герпесвирусов человека на сегодня включает 8 различных ДНК-содержащих вирусов, обладающих способностью инфицировать здоровых людей [19]. Среди всего многообразия герпесвирусов человека именно вирус простого герпеса 1 типа чаще других обнаруживается в клетках и ткани роговицы [108]. Известно, что на вероятность инфицирования ВПГ-1 значительное влияние оказывает социально-экономический статус населения. С точки зрения донорства, описанная герпетическая инфекция остается актуальной и в кадаверных глазах.

С развитием методики ПЦР-анализа в литературе появилось множество сообщений о предполагаемой герпесвирусной этиологии отторжения трансплантата роговицы после кератопластических операций [61]. Также было установлено, что в послеоперационном периоде ВПГ-1 способен вызывать герпетический кератит трансплантата роговицы у пациентов без предшествующих герпесвирусных заболеваний в анамнезе [159]. Показана способность вируса простого герпеса 1 типа поражать трупные донорские роговицы, хранящиеся в консервационных растворах глазных тканевых банков в условиях гипотермии.

Известно, что вирус простого герпеса 1 типа способен передаваться через трансплантат роговицы в ходе кератопластических операций неинфицированным реципиентам, реактивироваться и вызывать отторжение трансплантата [158].

В последние годы офтальмологи всё чаще стали прибегать к трансплантации отдельных гистологических комплексов роговицы, например, эндотелиальной кератопластике (задней автоматизированной послойной кератопластике и пересадке Десцеметовой мембраны). Однако на фоне данных

хирургических вмешательств также стали появляться сообщения о развитии реакции отторжения трансплантата по причине развития цитопатических явлений в слое пересаженного заднего эпителия, что было вызвано реактивацией латентного вируса простого герпеса 1 типа [42].

Всё вышеизложенное свидетельствует о том, что проблема диагностики предтрансплантационной контаминации донорских роговиц вирусом простого герпеса 1 типа, а также способы его деконтаминации на этапе консервации донорского материала в настоящее время не разработаны в мире, и представляют несомненную актуальность как для клинической офтальмологии, так и для фундаментальной медицины.

В связи с этим была определена цель данного исследования – разработка технологии предоперационной вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц на этапе консервации в условиях глазного тканевого банка.

Для выполнения поставленной цели и согласно сформулированным задачам исследование было разделено на 6 последовательных этапов, включающих: оценку распространенности вируса простого герпеса 1 типа в трупных донорских роговицах глазного тканевого банка; разработку оригинальной рецептуры консервационного раствора с противовирусными свойствами и способностью стимулировать выработку эндогенного интерферона в клетках роговицы; оценку влияния разработанного раствора и предлагаемой технологии консервации на задний эпителий трупных донорских роговиц; изучение противовирусной эффективности разработанного консервационного раствора в отношении вируса простого герпеса 1 типа; оценке способности клеточных культур кератоцитов и фибробластов, а также ткани роговицы к продукции собственного интерферона- β при стимуляции индукторами интерферонов; изучение противовирусной эффективности предложенного консервационного раствора в модельном эксперименте *ex vivo* на полученном клиническом материале и, затем, на донорском материале глазного тканевого банка.

Первый этап работы заключался в изучении распространенности вируса простого герпеса 1 типа в трупных донорских роговицах Глазного тканевого банка.

Для проведения данного этапа исследования из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России были получены 32 глаза от 16 доноров-трупов.

На данном этапе исследования трупные донорские роговицы (роговично-склеральные диски) выкраивались в операционной Глазного тканевого банка в соответствии с «Алгоритмом заготовки трупных роговиц человека для трансплантации» [1]. Полученные роговицы ($n = 32$) помещались в стерильные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл с транспортным раствором (1000 мкл), после чего пробирки нумеровались, укупоривались и направлялись на исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1).

Данный этап исследования был необходим, поскольку в литературе не представлены данные о распространенности ВПГ-1 в кадаверном материале Глазных тканевых банков России. Также население г. Москвы имеет свой уникальный социально-экономический состав, что сказывается на инфекционной составляющей донорского материала [3].

По результатам проведенного этапа работы было установлено, что 16,62% трупных донорских роговиц глазного тканевого банка содержат ДНК ВПГ-1. Полученные в ходе первого этапа работы результаты согласуются с данными отечественных и зарубежных исследователей [3; 113].

Распространенность вируса простого герпеса 1 типа в кадаверном материале Глазного тканевого банка может объясняться тем, что значительная часть трупного донорского материала забирается у лиц без определенного места жительства, поскольку известно, что социально-экономический уровень доноров влияет на вероятность инфицирования многими вирусами, в том числе ВПГ-1. Так, по опубликованным данным Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ

«МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва), показано, что частота встречаемости вируса иммунодефицита человека, вирусов гепатита В и С, сифилиса, выше у доноров Глазного тканевого банка г. Москвы при сравнении с данными Европейской ассоциации глазных банков [3]. Необходимо дальнейшее углубленное изучение эпидемиологической ситуации по вопросу контаминации кадаверного материала Глазного тканевого банка семейством герпесвирусов.

Второй этап исследования состоял в разработке консервационного раствора для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц в условиях глазного тканевого банка.

На данном этапе проводилась разработка раствора, обладающего консервационными, противовирусными и иммуномодулирующими свойствами, при этом подходящего для органного культивирования. Консервационные растворы с противовирусными свойствами не описаны в литературе, поскольку основное внимание ученых занимает этап серологической диагностики донора [1]. При этом современные консервационные растворы обязательно имеют в своем составе антибиотики и антимикотики [1; 2].

В качестве базового раствора, обеспечивающего консервационные свойства, была использована среда для консервации донорских роговиц, предложенная отечественными учеными-офтальмологами (патент РФ № 93010287). Данная среда соответствует аминокислотному составу водянистой влаги передней камеры глаза, содержит компоненты, стабилизирующие клеточные мембраны и внутриклеточные органеллы, что позволяет сохранять роговицу при гипотермии в течение 6 суток в условиях глазного тканевого банка. Также обязательными компонентами данной среды являются антибиотики, препятствующие размножению бактерий, и антимикотики, обладающие фунгицидным или фунгистатическим действием в отношении патогенов грибковой природы, однако данный раствор лишен противовирусных компонентов.

Противовирусный эффект разработанного раствора обусловлен входящим в состав аномальным нуклеозидом ганцикловиром и индуктором интерферона Циклофероном, поскольку данные препараты эффективны в лечении герпетических поражений роговицы. Известно, что ганцикловир обладает выраженным противовирусным действием в отношении герпесвирусов, в том числе ВПГ-1. Под действием вирусной тимидинкиназы внутри инфицированной клетки ганцикловир фосфорилируется. Образовавшийся в результате ряда последовательных превращений ганцикловиртрифосфат повреждает цикл воспроизводства вируса внутри клетки путем конкурентного ингибирования вирусной ДНК-полимеразы и встраивания в вирусную ДНК. Созданная в таких условиях ДНК больше не обладает инфекционными свойствами [12; 57].

Также Циклоферон, относящийся к фармакологической группе интерферонов и индукторов интерферонов, был использован в качестве иммуномодулирующего компонента. Применение данного препарата обусловлено необходимостью активировать врожденные естественные противовирусные биологические системы клеток в борьбе с ВПГ-1, что возможно осуществить благодаря особенностям клеточного состава роговицы [75]. Так, с точки зрения эмбриологии роговица представляет собой уникальное образование, в котором строма и эндотелий происходят из эктодермы (клеток нервного гребня), передний эпителий – из поверхностной эктодермы [4]. Строма – наиболее объемный слой роговицы (до 90% ее толщины), состоит из кератоцитов и коллагеновых пластинок. Кератоциты, занимающие около 10% объема стромы, представляют собой высокодифференцированные фибробласты. При этом фибробласты и кератоциты в эмбриогенезе имеют общее происхождение, чем обусловлена способность кератоцитов переходить в фибробласты под действием факторов внешней среды. В результате инфекционного воздействия на роговицу, вызванного вирусом простого герпеса 1 типа, кератоциты активируются и переходят в фибробласты, которые в свою очередь экспрессируют на своих мембранах рецепторы TLR-3 [75]. Данный тип рецепторов ответственен за передачу сигнала на запуск противовирусного внутриклеточного каскада,

приводящего к выработке интерферонов 1 типа (интерферона- α и интерферона- β) и провоспалительных цитокинов. Также активация данных звеньев врожденного иммунитета может вызываться индуктором интерферона, что приводит к локализации и элиминации вирусной инфекции. На сегодня известно, что фибробласты экспрессируют преимущественно интерферон- β (фибробластный интерферон). По нашему мнению, активация естественных противовирусных систем клетки за счет внесения в состав консервационного раствора индуктора интерферона способствует эффективной вирусной деконтаминации.

Разработанный на данном этапе работы состав консервационного раствора и условия консервации согласуются с данными литературы: прямое температурное влияние в ходе органного культивирования оказывает угнетающее воздействие на ВПГ-1, поскольку известно, что ВПГ-1 относится к термолабильным вирусам. Так, температурный режим консервации оказывает прямое воздействие на жизнеспособность ВПГ-1 [19; 146]. Косвенное воздействие температуры обусловлено усилением противовирусной активности звеньев врожденного иммунитета [73; 77]. В связи с этим для усиления противовирусного действия интерферонов и ускорения метаболизма клеток разработанный раствор адаптирован для органотипической консервации.

Третий этап работы заключался в изучении влияния разработанного раствора и предлагаемой технологии (опытная группа) на эндотелий трупных донорских роговиц в сравнении со стандартной технологией консервации (контрольная группа).

Для этого ежедневно в течение 6 суток консервации оценивались центральные морфометрические характеристики эндотелиальных клеток (плотность, площадь и критерий гексагональности). По окончании консервации изучалась жизнеспособность, функциональная активность, фенотипическая характеристика, а также оценивалось микростроение пласта эндотелиальных клеток и складчатость Десцеметовой мембраны. Также проводился анализ стерильности консервационного раствора после вирусной деконтаминации.

В результате проведенного на данном этапе морфометрического исследования было установлено, что плотность эндотелиальных клеток роговиц опытной группы, прошедших вирусную деконтаминацию, на 6-е сутки консервации составила $2193,27 \pm 31,62$ клетки/мм². При этом к 6-м суткам консервации не было выявлено статистически значимых отличий в плотности, площади и критерии гексагональности эндотелиальных клеток опытной и контрольной групп.

При сравнении полученных результатов оценки жизнеспособности, функциональной активности и фенотипа эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах не было выявлено статистически значимых отличий. По данным проведенной сканирующей электронной микроскопии в микростроении пласта эндотелиальных клеток также не было выявлено отличий между образцами опытной и контрольной групп. Анализ образцов опытных консервационных растворов после вирусной деконтаминации на автоматизированном бактериологическом анализаторе показал сохранность стерильности, что было подтверждено стандартным бактериологическим посевом рутинным способом.

Полученные в ходе третьего этапа исследования результаты согласуются с данными литературы: предложенная рецептура консервационного раствора и технология консервации не оказывают воздействия на эндотелиальные клетки консервированных донорских роговиц по сравнению с применяемой в глазных тканевых банках базовой технологией консервации [1; 2].

Четвертый этап исследования состоял в изучении противовирусной эффективности и проводился на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по стандартной методике в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Цитотоксическое действие опытных и контрольных образцов консервационных растворов оценивали по изменению морфологии и жизнеспособности перевиваемой культуры клеток почечного эпителия

африканских зелёных мартышек (клеточная линия Vero) [37; 142]. Результаты учитывали визуально методом световой микроскопии с помощью инвертированного микроскопа. Количество жизнеспособных клеток определяли методом исключения витального красителя трипанового синего. Число жизнеспособных клеток подсчитывали в камере Горяева.

Оценка противовирусной эффективности раствора для вирусной деконтаминации проводилась с применением клеточной линии Vero и музейного штамма ВПГ-1. Инфекционные титры ВПГ-1 определяли стандартным методом титрования, рассчитывали по методу Рида и Менча [157].

По результатам проведенного этапа исследования было установлено, что раствор для вирусной деконтаминации не оказывает выраженного цитопатического действия на культуру клеток Vero в процессе культивирования. Жизнеспособность клеток Vero при культивировании с раствором для вирусной деконтаминации составила 99,7%. Отсутствовала статистически значимая разница в цитопатическом действии на клетки Vero между раствором для вирусной деконтаминации и раствором для хранения роговицы, применяемым в Глазных тканевых банках.

Также на данном этапе работы было установлено, что раствор для вирусной деконтаминации обладает выраженной противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса 1 типа. Так, использование раствора по терапевтической и профилактической схемам привело к снижению инфекционной активности тест-вируса на 3,1 lg и 3,4 lg, соответственно, по сравнению с положительным контролем – инфицированными ВПГ-1 клетками Vero на среде DMEM. Коэффициент вирусного ингибирования разработанного раствора при использовании по терапевтической и профилактической схемам составил, соответственно, 56,4% и 56,7%. Сравнительный анализ противовирусной эффективности раствора для вирусной деконтаминации и раствора для хранения роговицы установил, что инфекционная активность, титр накопления ВПГ-1 были статистически значимо меньше после применения разработанного раствора, при

этом коэффициент вирусного ингибирования после применения разработанного раствора был статистически значимо выше, чем аналогичный параметр на фоне применения раствора для хранения роговицы.

Результаты, полученные в ходе четвертого этапа работы, не противоречили данным литературы: выраженный противовирусный эффект разработанного консервационного раствора в отношении вируса простого герпеса 1 типа вызван входящими в состав противовирусными компонентами – аномальным нуклеозидом и индуктором интерферона [12; 116].

Пятый этап работы заключался в изучении способности разработанного раствора и предлагаемой технологии стимулировать активацию звеньев врожденного иммунитета в клетках и ткани роговицы.

Для выполнения данного этапа исследования из трупных донорских роговиц были получены образцы стромы, из которых щадящим методом были выделены клеточные культуры.

Проведенное в ходе данного этапа работы иммуноцитохимическое исследование полученных клеточных культур показало соответствие полученных клеточных культур определяемым фенотипам.

Полученные в ходе клеточного культивирования кератоциты и фибробласты стимулировались различными индукторами интерферона. По результатам иммуноферментного анализа было установлено, что добавление как Циклоферона, так и Полудана к культуре фибробластов вызывало достоверно большую продукцию эндогенного интерферона, чем при добавлении данных препаратов к клеточной культуре кератоцитов.

На данном этапе работы были показаны отличия клеточных культур кератоцитов и фибробластов трупных донорских роговиц в способности синтезировать интерфероны 1 типа после стимуляции индукторами интерферона. Также проведен иммуноферментный анализ консервационных растворов после вирусной деконтаминации на содержание в них эндогенных интерферонов.

Полученные результаты показали активацию системы врожденного иммунитета роговицы во время консервации по предлагаемой технологии. Количество эндогенного интерферона- α и интерферона- β в образцах растворов для вирусной деконтаминации составило, соответственно, $14,16 \pm 4,15$ пг/мл и $23,85 \pm 6,32$ пг/мл. В образцах растворов для хранения роговицы эндогенные интерфероны не определялись.

До настоящего момента возможность синтеза собственных интерферонов в трупной донорской роговице после стимуляции индукторами интерферонов не изучалась. В зарубежной литературе также отсутствуют соответствующие работы.

Полученные в ходе данного этапа работы результаты согласуются с описанным в литературе механизмом противовирусной защиты роговицы системой врожденного иммунитета и особенностями рецепторного аппарата клеток роговицы человека [75; 119; 133; 151].

Шестой этап исследования состоял в оценке противовирусной эффективности предлагаемой технологии при помощи ПЦР на примере патологически измененных роговичных дисков реципиентов с кератитами герпетической этиологии и, затем, на примере трупных донорских роговиц, контаминированных ВПГ-1.

По полученным в ходе ПЦР-анализа данным было установлено, что консервация роговиц в растворе для вирусной деконтаминации статистически значимо снижала как количество вирусных копий на 1 мл образца, так и количество вирусных копий на клетку. В результате сравнительного анализа противовирусной эффективности было установлено, что предлагаемая технология консервации роговиц в растворе для вирусной деконтаминации, в отличие от базисной технологии консервации в растворе для хранения роговицы, достоверно приводит к значительному снижению вирусных копий ВПГ-1.

Применение ПЦР на данном этапе исследования обосновано современными стандартами лабораторной диагностики герпетической инфекции, которые

постепенно переходят от методов культивирования к методам, основанным на полимеразной цепной реакции [35; 127].

Таким образом, технология вирусной деконтаминации донорских роговиц на этапе консервации, заключающаяся в создании противовирусного консервационного раствора для органотипической консервации, способствует эффективной деконтаминации донорских роговиц от вируса простого герпеса 1 типа, а также активирует внутриклеточные биологические механизмы врожденного противовирусного иммунитета, что установлено на основании результатов проведенного исследования.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа распространенности вируса простого герпеса 1 типа в трупных донорских роговицах, поступающих в Глазной тканевой банк, проведенного с помощью полимеразной цепной реакции, установлено: среди трупов-доноров роговиц со средним возрастом 54 года ($\pm 3,4$ года) доля контаминированного материала составила 16,62%; доля контаминации вирусом контрлатеральных роговиц из парных глаз составила 18,75%.

2. На основании изученных вирусологических и патофизиологических закономерностей в эксперименте разработана оригинальная рецептура раствора для вирусной деконтаминации донорских роговиц на этапе предоперационной подготовки (консервации) трансплантата в условиях Глазного тканевого банка, показана его высокая противовирусная эффективность.

3. В эксперименте *in vitro* установлено, что предложенный раствор не оказывает повреждающего воздействия на эндотелий трупных донорских роговиц в процессе их консервации: плотность эндотелиальных клеток к предельному сроку консервации (на 6 сутки) составляла $2193,27 \pm 31,62$ клетки/ мм^2 , из которых 97,23% были жизнеспособными по результатам иммуноцитохимического анализа.

4. На основании анализа противовирусной эффективности, проведенного по стандартным методикам *in vitro*, установлено, что раствор предложенной рецептуры обладает выраженными противовирусными свойствами в отношении вируса простого герпеса 1 типа: коэффициент ингибирования ВПГ-1 составил 56,7% в сравнении с контрольным (стандартным) раствором, применяемым для консервации роговицы в Глазном тканевом банке (8,3%).

5. В эксперименте *in vitro* установлено, что входящий в состав предложенного раствора индуктор интерферона стимулирует клеточные культуры кератоцитов к продукции интерферона- α и интерферона- β в количествах $6,71 \pm 2,19$ пг/мл и $8,51 \pm 2,56$ пг/мл, соответственно, при этом стимуляция культуры фибробластов вызывала экспрессию интерферона- α и интерферона- β в количествах $11,06 \pm 3,34$ пг/мл и $46,49 \pm 8,25$ пг/мл, соответственно.

6. На основании проведенных экспериментальных исследований установлено, что предложенная Технология вирусной деконтаминации донорских роговиц на этапе предоперационной подготовки и консервации обладает выраженной противовирусной эффективностью в отношении ВПГ-1.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенная технология вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц на этапе консервации обеспечит эффективную профилактику передачи герпесвирусной инфекции от донора к реципиенту в ходе кератопластических вмешательств, в том числе высокого риска.
2. Добавление индукторов интерферонов в состав консервационных растворов в сочетании с нормотермическим культивированием стимулируют клетки и ткань роговицы человека к активации звеньев врожденного иммунитета и продукции собственных эндогенных интерферонов 1 типа (ИФН- α и ИФН- β).
3. Разработанная технология консервации роговиц при дальнейшем изучении позволит в раннем послеоперационном периоде защитить трансплантат трупной донорской роговицы от воздействия патогенных факторов инфекционной природы.
4. Использованный протокол обнаружения продукции ИФН клетками и тканью донорской роговицы, а также структура данного исследования могут использоваться для дальнейших разработок консервационных растворов с противовирусными свойствами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВПГ-1	Вирус простого герпеса 1 типа (Human alphaherpesvirus 1)
ВПГ-2	Вирус простого герпеса 2 типа (Human alphaherpesvirus 2)
дц-РНК	Двуцепочечная-РНК
ИГХ	Иммуногистохимический анализ
ИФА	Иммуноферментный анализ
ИФН	Интерферон
ИЦХ	Иммуноцитохимический анализ
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
СКП	Сквозная кератопластика
ЦПД	Цитопатическое действие
IFNAR	Рецептор интерферона- α / β
ИКК	ИкВ-киназный комплекс
IRF	Интерферон-регуляторный фактор
ISG	Интерферон-стимулированные гены
ISRE	Интерферон-стимулированные элементы ответа
JAK	Янус-активированная киназа
MyD88	Белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88
NF- κ B	Транскрипционный ядерный фактор каппа-Б
PAMP	Патоген-ассоциированный молекулярный паттерн
PRR	Паттерн-распознающий рецептор
STAT	Белки-преобразователи сигнала и активаторы транскрипции
STING	Белок-стимулятор генов, ответственных за выработку интерферона
TBK-1	Tank-связывающая киназа-1
TLR	Toll-подобный рецептор
TNF	Фактор некроза опухоли
TRAF6	Фактор 6, связанный с рецептором фактора некроза опухоли
TRIF	Белок, индуцирующий образование интерферона- β
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борзенок С.А. Алгоритм заготовки трупных роговиц человека для трансплантации / С.А. Борзенок, Б.Э. Малюгин, Н.А. Гаврилова [и др.] // М. : ГБОУ ВПО МГМСУ МЗ РФ, 2016. – 20 с.
2. Борзенок С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: дисс. ... докт. мед наук: 14.01.07 / Сергей Анатольевич Борзенок. – М., 2008. – 308 с.
3. Борзенок С.А. Скрининг гемотрансмиссивных инфекций у посмертных доноров роговицы в Глазном тканевом банке НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» / С.А. Борзенок, М.Ю. Герасимов, Х.Д. Тонаева [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – т. 22. – № 1. – С. 50-54.
4. Вит В.В. Строение зрительной системы человека - учебное пособие / В.В. Вит. – Одесса. : Астропринт, 2003. – 368 с.
5. Деев Л.А. Заболевания роговой оболочки глазного яблока: учебно-методическое пособие / Л.А. Деев, Н.С. Ярцева. – Смоленск, 2006. – 57 с.
6. Ершов Ф.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) / Ф.И. Ершов, О.И. Киселев // Рос. акад. мед. наук. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 356 с.
7. Ершов Ф.И. Основные итоги изучения системы интерферона к 2011 году / Ф.И. Ершов, А.Н. Наровлянский // Интерферон-2011. Сборник научных статей / под ред. Ф. И. Ершова, А. Н. Наровлянского. – М., 2012. – 512 с.
8. Ершов Ф.И. Применение интерферонов 1-го и 2-го типов при вирусных инфекциях / Ф.И. Ершов // Вопросы вирусологии. – 2013. – № S1. – С. 145-154.
9. Ершов Ф.И. Результаты и перспективы использования индукторов интерферона в лечении инфекционных болезней / Ф.И. Ершов, А.А.

- Шульдяков, М.Г. Романцов [и др.] // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2013. – т. 68. – № 10. – С. 46-52.
10. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии / Ф.И. Ершов // Рос. акад. мед. наук. – М. : Медицина, 1996. – 239 с.
 11. Ершов Ф.И. Теоретические и прикладные аспекты системы интерферонов: к 60-летию открытия интерферонов / Ф.И. Ершов, А.Н. Наровлянский // Вопросы вирусологии. – 2018. – т. 63. – № 1. – С. 10-18.
 12. Ершов Ф.И. Циклоферон. Клиническая фармакология и терапия: Руководство для врачей / Ф.И. Ершов, А.Л. Коваленко, М.Г. Романцов [и др.] // М.; СПб., 1998. – 109 с.
 13. Калюжин О.В. Тилорон как средство выбора для профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций / О.В. Калюжин // Лечащий врач. – 2013. – № 10. – С. 43-48.
 14. Карсонова АВ. Система интерферонов I типа и НК-клеток при часто рецидивирующем простом герпесе : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.09 / Антонина Васильевна Карсонова ; – М., 2014. – 148 с.
 15. Каспаров А.А. Офтальмогерпес / А.А. Каспаров. – М. : Изд-во Медицина, 1994. – 224 с.
 16. Каспаров А.А. Современные аспекты лечения герпес-вирусного кератита / А.А. Каспаров // Клин. офтальмология. – 2000. – № 2. – С. 59-63.
 17. Коваленко А.Л. Иммунный ответ при вирусных инфекциях: Руководство для врачей / А.Л. Коваленко [и др.] ; под ред. Ф.И. Ершова, М.Г. Романцова. – СПб., 1998. – 67 с.
 18. Лошкарева А.О. Терапия хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с использованием аутологичной богатой тромбоцитами плазмы : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.07 / Анастасия Олеговна Лошкарева ; – М., 2018. – 131 с.
 19. Львов Д.К. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Д.К. Львов [и др.] ; под ред. академика РАН Д.К.

- Львова. – М. : ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. – 1200 с.
20. Майчук Д.Ю. Офтальмоферон - 15 лет широкого применения в лечении и профилактике инфекционных заболеваний глаз / Д.Ю. Майчук, Ю.Ф. Майчук // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2017. – т. 1. – № 18. – С. 82-100.
 21. Майчук Ю.Ф. Оптимизация фармакотерапии воспалительных болезней глазной поверхности / Ю.Ф. Майчук // Российский офтальмологический журнал. – 2008. – № 3. – С. 18-25.
 22. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / А.Н. Миронов [и др.]. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
 23. Хубутя М.Ш. Проблемы обеспечения инфекционной безопасности органного и тканевого донорства при лабораторной диагностике гемоконтактных вирусных инфекций / М.Ш. Хубутя, С.А. Солонин, М.А. Годков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – т. 18. – № 1. – С. 83-90.
 24. Чернакова Г.М. Микст-инфекции и воспалительная офтальмопатология: клинико-лабораторные наблюдения / Г.М. Чернакова, Д.Ю. Майчук, Е.А. Клещева [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2017. – т. 133. – № 4. – С. 74-82.
 25. Чернобровцев П.А. Использование молекулярно-генетических методов в медико-биологических исследованиях. / М.С. Кишеня, С.В. Пищулина, С.К. Кульков [и др.] // Донецкие чтения 2016. Материалы I Международной научной конференции / под ред. проф. С.В. Беспаловой. – Ростов-на-Дону, 2016. – т. 2. – С. 424-426.
 26. Abrams M.E. IFN-alpha induces MxA gene expression in cultured human corneal fibroblasts / M.E. Abrams, M.J. Balish, C.R. Brandt // Exp. Eye. Res. – 1995. – Vol. 60, № 2. – P. 137-142.

27. Acharya M. Commentary: Herpes keratitis: A diagnostic challenge / M. Acharya, A. Dave, J.H. Farooqui // *Indian J. Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 67, № 7. – P. 1046-1047.
28. Akanda Z.Z. Graft rejection rate and graft failure rate of penetrating keratoplasty (PKP) vs lamellar procedures: a systematic review / Z.Z. Akanda, A. Naeem, E. Russell [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. e0119934.
29. Al-Dujaili L.J. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? / L.J. Al-Dujaili, P.P. Clerkin, C. Clement [et al.] // *Future Microbiol.* – 2011. – Vol. 6, № 8. – P. 877-907.
30. Aliabadi N. Diagnosing of herpes simplex virus infections in suspected patients using real-time PCR / N. Aliabadi, M. Jamalidouost, S. Asaei [et al.] // *Jundishapur J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 8, № 2. – P. e16727.
31. Altay Y. The outcome of penetrating keratoplasty for corneal scarring due to herpes simplex keratitis / Y. Altay, S. Tamer, A.S. Kaya [et al.] // *Arq. Bras. Oftalmol.* – 2017. – Vol. 80, № 1. – P. 41-45.
32. Amiri F. Corneal transplantation: A new view of life / F. Amiri, S. Ghiyasvandian, E. Navab [et al.] // *Electron Physician.* – 2017. – Vol. 9, № 4. – P. 4055-4063.
33. Anderson K.V. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: The induction of polarity by the Toll gene product / K.V. Anderson, L. Bokla, C. Nusslein-Volhard // *Cell.* – 1985. – Vol. 42. – P. 791-798.
34. Armitage W.J. The first successful full-thickness corneal transplant: a commentary on Eduard Zirm's landmark paper of 1906 / W.J. Armitage, A.B. Tullo, D.F. Larkin // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 90, № 10. – P. 1222-1223.
35. Arshad Z. Tools for the Diagnosis of Herpes Simplex Virus 1/2: Systematic Review of Studies Published Between 2012 and 2018 / Z. Arshad, A. Alturkistani, D. Brindley [et al.] // *JMIR Public Health Surveill.* – 2019. Vol. 5, № 2. – P.e14216.
36. Asi F. Descemet membrane endothelial keratoplasty for corneal decompensation caused by herpes simplex virus endotheliitis / F. Asi, G. Milioti, B. Seitz // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2018. – Vol. 44, № 1. – P.106-108.

37. Athmanathan S. Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line with Vero cells in the isolation of Herpes simplex virus-1 for the laboratory diagnosis of Herpes simplex keratitis / S. Athmanathan, S.B. Reddy, R. Nutheti [et al.] // *BMC Ophthalmol.* – 2002. – Vol. 2, art. № 3.
38. Aydemir O. The relationship of graft survival and herpes simplex virus latency in recipient corneal buttons / O. Aydemir, P. Türkçüoğlu, Y. Bulut [et al.] // *Clin. Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 1, № 2. – P. 127-131.
39. Azar D.T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing / D.T. Azar // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 2006. – Vol. 104. – P. 264-302.
40. Azher T.N. Herpes simplex keratitis: challenges in diagnosis and clinical management / T.N. Azher, X.T. Yin, D. Tajfirouz [et al.] // *Clin. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 11. – P. 185-191.
41. Barker N.H. Ocular herpes simplex / N.H. Barker // *BMJ Clin. Evid.* – 2008. Vol. 2008. – P.0707.
42. Basak S.K. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty in Irreversible Corneal Edema Due to Herpes Simplex Virus Endotheliitis / S.K. Basak, S. Basak // *Cornea.* – 2020. – Vol. 39, № 1. – P. 8-12.
43. Bhat N. Recognition of cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors / N. Bhat, K.A. Fitzgerald // *Eur. J. Immunol.* – 2014. – Vol. 44, № 3. – P. 634-640.
44. Biswas S. Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus / S. Biswas, P. Suresh, R.E. Bonshek [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 84, № 7. – P. 701-705.
45. Borderie V.M. Culture-proven herpetic keratitis after penetrating keratoplasty in patients with no previous history of herpes disease / V.M. Borderie, J.F. Méritet, C. Chaumeil [et al.] // *Cornea.* – 2004. – Vol. 23, № 2. – P. 118-124.
46. Bourne R.R.A. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic

- review and meta-analysis / R.R.A. Bourne, S.R. Flaxman, T. Braithwaite [et al.] // *Lancet Glob. Health.* – 2017. – Vol. 5, № 9. – P.e888-e897.
47. Bowman B.R. Structure of the herpesvirus major capsid protein / B.R. Bowman, M.L. Baker, F.J. Rixon [et al.] // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22, № 4. – P. 757-765.
48. Brown J.C. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis / J.C. Brown, W.W. Newcomb // *Curr. Opin. Virol.* – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 142-149.
49. Buela K.A. Cornea-infiltrating and lymph node dendritic cells contribute to CD4+ T cell expansion after herpes simplex virus-1 ocular infection / K.A. Buela, R.L. Hendricks // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194, № 1. – P. 379-387.
50. Builles N. Major endothelial loss from corneas in organ culture: importance of second endothelial count / N. Builles, L. Kodjikian, C. Burillon // *Cornea.* – 2006. – Vol. 25, № 7. – P. 815-820.
51. Butler T.K. Infective keratitis in older patients: a 4 year review, 1998-2002 / T.K. Butler, N.A. Spencer, C.C. Chan [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 89, № 5. – P. 591-596.
52. Cantin E.M. Detection of herpes simplex virus DNA sequences in corneal transplant recipients by polymerase chain reaction assays / E.M. Cantin, J. Chen, J. McNeill [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 1991. – Vol. 10S. – P. 15-21.
53. Carr D.J. Interferon-beta suppresses herpes simplex virus type 1 replication in trigeminal ganglion cells through an RNase L-dependent pathway / D.J. Carr, K. Al-khatib, C.M. James // *J. Neuroimmunol.* – 2003. – Vol. 141, № 1-2. – P. 40-46.
54. Cathcart H.M. Interferon-gamma, macrophages, and virus spread after HSV-1 injection / H.M. Cathcart, M. Zheng, J.J. Covar [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 7. – P. 3984-3993.
55. Chawla-Sarkar M. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis / M. Chawla-Sarkar, D.J. Lindner, Y.F. Liu [et al.] // *Apoptosis.* – 2003. – Vol. 8, № 3. – P. 237-249.
56. Chiang H.S. The Molecular Basis of Viral Inhibition of IRF- and STAT-Dependent Immune Responses / H.S. Chiang, H.M. Liu // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 8, № 9. – P. 3086.

57. Chodosh J. Adoption of Innovation in Herpes Simplex Virus Keratitis / J. Chodosh, L. Ung. // *Cornea*. – 2020. – Vol. 39, Suppl. 1, № 1. – P. S7-S18.
58. Choong K. Aciclovir-resistant herpes keratitis. / K. Choong, N.J. Walker, A.J. Apel // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 38. – P. 309-313.
59. Chou T.Y. Ganciclovir ophthalmic gel 0.15% for the treatment of acute herpetic keratitis: background, effectiveness, tolerability, safety, and future applications / T.Y. Chou, B.Y. Hong // *Ther. Clin. Risk Manag.* – 2014. – Vol. 10. – P. 665-681.
60. Chucair-Elliott A.J. Degeneration and regeneration of corneal nerves in response to HSV-1 infection / A.J. Chucair-Elliott, M. Zheng, D.J. Carr // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2015. – Vol. 56, № 2. – P.1097-1107.
61. Cleator G.M. Corneal donor infection by herpes simplex virus: herpes simplex virus DNA in donor corneas / G.M. Cleator, P.E. Klapper, C. Dennett [et al.] *Cornea*. – 1994. – Vol. 13, № 4. – P. 294-304.
62. Cockerham G.C. Herpes simplex virus in primary graft failure / G.C. Cockerham, A.E. Krafft, I.W. McLean // *Arch. Ophthalmol.* – 1997. – Vol. 115, № 5. – P. 586-589.
63. Cohen P. The TLR and IL-1 signalling network at a glance / P. Cohen // *J. Cell Sci.* – 2014. – Vol. 127, Pt. 11. – P.2383-2390.
64. Cohrs R.J. Asymptomatic alphaherpesvirus reactivation / R.J. Cohrs, D.M. Koelle, M.C. Schuette [et al.] // In: T.R. Gluckman, editor. *Herpesviridae: Viral Structure, Life Cycle and Infections*. Nova Science Publishers Inc.; Hauppauge, NY, USA. – 2009. – P. 133-168.
65. Cook S.D. Herpes simplex virus: molecular biology and the possibility of corneal latency / S.D. Cook, J.H. Hill // *Surv. Ophthalmol.* – 1991. – Vol. 36, № 2. – P. 140-148.
66. Croasdale C.R. Eye bank tissue utilization between endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty / C.R. Croasdale, E. Barney, E.J. Warner // *Cornea*. – 2013. – Vol. 32, № 3. – P. 280-284.

67. Cruz G.K.P. Clinical and epidemiological aspects of cornea transplant patients of a reference hospital / G.K.P. Cruz, I.C. Azevedo, D.P.S.R.P. Carvalho // *Rev. Lat. Am. Enfermagem.* – 2017. – Vol. 25. – P.e2897.
68. Dai X. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes / X. Dai, Z.H. Zhou // *Science.* – 2018. – Vol. 360, № 6384. – P. eaao7298.
69. Danastas K. Herpes Simplex Virus Type 1 Interactions with the Interferon System / K. Danastas, M. Miranda-Saksena, A.L. Cunningham // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 14. – P. 5150.
70. De Kesel R.J. Primary graft failure caused by herpes simplex virus type 1 / De Kesel R.J., Koppen C., Ieven M. [et al.] // *Cornea.* – 2001. – Vol. 20, № 2. – P. 187-190.
71. Deguine J. MyD88: a central player in innate immune signaling / J. Deguine, G.M. Barton // *F1000Prime Rep.* – 2014. – Vol 6. – P. 97.
72. Dhillon B. The Evolving Role of TRAFs in Mediating Inflammatory Responses / B. Dhillon, F. Aleithan, Z. Abdul-Sater [et al.] // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 104.
73. Downing J.F. Hyperthermia in humans enhances interferon-gamma synthesis and alters the peripheral lymphocyte population / J.F. Downing, H. Martinez-Valdez, R.S. Elizondo [et al.] // *J. Interferon Res.* – 1988. – Vol. 8, № 2. – P. 143-150.
74. Duman F. Indications and outcomes of corneal transplantation in geriatric patients / F. Duman, M. Kosker, K. Suri [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 156, № 3. – P. 600-607.e2.
75. Ebihara N. Expression and function of toll-like receptor-3 and -9 in human corneal myofibroblasts / N. Ebihara, S. Yamagami, L. Chen [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2007. – Vol. 48, № 7. – P. 3069-3076.
76. El-Aal A.M. Evaluation of herpes simplex detection in corneal scrapings by three molecular methods / A.M. El-Aal, M. El Sayed, E. Mohammed [et al.] // *Curr. Microbiol.* – 2006. – Vol. 52, № 5. – P. 379-382.

77. Evans S.S. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat / S.S. Evans, E.A. Repasky, D.T. Fisher // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15, № 6. – P. 335-349.
78. Farhatullah S. Diagnosis of herpes simplex virus-1 keratitis using Giemsa stain, immunofluorescence assay, and polymerase chain reaction assay on corneal scrapings / S. Farhatullah, S. Kaza, S. Athmanathan [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 88, № 1. – P.142-144.
79. Filatov V.P. Transplantation of the cornea. / V.P. Filatov, O. Sitchevska // *Arch. Ophthalmol.* – 1935. – Vol 13. № 3. – P. 321-347.
80. Flaxman S.R. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. / S.R. Flaxman, R.R.A. Bourne, S. Resnikoff [et al.] // *Lancet Glob. Health.* – 2017. – Vol. 5, № 12. – P. e1221-e1234.
81. Frank G.M. Early responding dendritic cells direct the local NK response to control herpes simplex virus 1 infection within the cornea / G.M. Frank, K.A. Buella, D.M. Maker [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 188, № 3. – P. 1350-1359.
82. Garweg J. Slow viral replication of HSV-1 is responsible for early recurrence of herpetic keratitis after corneal grafting / J. Garweg, M. Böhnke // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 1996. – Vol. 234, № S1. – P. 133-138.
83. Gatzoufas Z. Graft-to-host transmission of herpes simplex virus - myth or reality? / Z. Gatzoufas, M. Oldak, A. Schnaidt [et al.] // *Acta. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 89, № 5. – P. e473-474.
84. Gatzoufas Z. Repeat corneal graft failure due to graft-to-host herpetic infection / Z. Gatzoufas, A. Hasenpus, B. Gyongyossy [et al.] // *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 24.
85. Goldschmidt P. Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of Herpesviruses and *Acanthamoeba* keratitis / P. Goldschmidt, H. Rostane, C. Saint-Jean [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 90, № 11. – P. 1354-1356.

86. Gonzalez-Navajas J.M. Immunomodulatory functions of type I interferons / J.M. Gonzalez-Navajas, J. Lee, M. David [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12, № 2. – P.125-135.
87. Goodfellow J.F. Antiviral treatment following penetrating keratoplasty for herpetic keratitis / J.F. Goodfellow, S. Nabili, M.N. Jones [et al.] // *Eye (Lond.)*. – 2011. – Vol. 25. № 4. – P. 470-474.
88. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response / B. Grinde // *J. Oral Microbiol.* – 2013. – P. 5:10.3402/jom.v5i0.22766.
89. Gruffat H. Herpesvirus late gene expression: a viral-specific pre-initiation complex is key / H. Gruffat, R. Marchione, E. Manet // *Front. Microbiol* – 2016. – №.7. – P. 869.
90. Grüter W. Experimental and clinical studies on so-called corneal herpes / W. Grüter // *Berichte über die Versammlung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft.* – 1920. – № 42. – P. 162-167.
91. Guess S. Evidence-based treatment of herpes simplex virus keratitis: a systematic review / S. Guess, D.U. Stone, J. Chodosh // *Ocul. Surf.* – 2007. – Vol. 5. – № 3 – P. 240-250.
92. Gupta N. Burden of corneal blindness in India / N. Gupta, R. Tandon, S.K. Gupta [et al.] // *Indian J. Community Med.* – 2013. – Vol. 38, № 4. – P. 198-206.
93. Gurung H.R. Fibroblast growth factor-2 drives and maintains progressive corneal neovascularization following HSV-1 infection / H.R. Gurung, M.M. Carr, K. Bryant [et al.] // *Mucosal Immunol.* – 2018. – Vol. 11, № 1. – P. 172-185.
94. Haller O. A tribute to Jean Lindenmann, co-discoverer of interferon (1924-2015) / O. Haller // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 76, № 1. – P. 113-115.
95. Hematian A. Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis / A. Hematian, N. Sadeghifard, R. Mohebi [et al.] // *Osong Public Health Res. Perspect.* – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 77-82.
96. Heming J.D. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging / J.D. Heming, J.F. Conway, F.L. Homa // *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* – 2017. – № 223. P. 119-142.

97. Hlinomazová Z. The treatment of HSV1 ocular infections using quantitative real-time PCR results / Z. Hlinomazová, V. Loukotová, M. Horáčková [et al.] // *Acta Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 90, № 5. – P. 456-60.
98. Holbach L.M. Infection of the corneal endothelium in herpes simplex keratitis / L.M. Holbach, N. Asano, G.O. Naumann // *Am. J. Ophthalmol.* – 1998. – Vol. 126, № 4. – P. 592-594.
99. Holler N. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule / N. Holler, R. Zaru, O. Micheau [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2000. – Vol. 1, № 6. – P. 489-495.
100. Horan K.A. Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors / K.A. Horan, K. Hansen, M.R. Jakobsen [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190, № 5. – P. 2311-2319.
101. Hung Y.F. Endosomal TLR3, TLR7, and TLR8 control neuronal morphology through different transcriptional programs / Y.F. Hung, C.Y. Chen, Y.C. Shih [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 217, № 8. – P. 2727-2742.
102. Inoue T. Utility of real-time PCR analysis for appropriate diagnosis for keratitis / T. Inoue, Y. Ohashi // *Cornea.* – 2013. – № 32, Suppl. 1. – P. S71-76.
103. Ivashkiv L.B. Regulation of type I interferon responses / L.B. Ivashkiv, L.T. Donlin // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 36-49.
104. Jaggi U. Role of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Glycoprotein K (gK) Pathogenic CD8+ T Cells in Exacerbation of Eye Disease / U. Jaggi, S. Wang, K. Tormanen [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – № 9. – P. 2895.
105. Jamali A. Characterization of Resident Corneal Plasmacytoid Dendritic Cells and Their Pivotal Role in Herpes Simplex Keratitis / A. Jamali, K. Hu, V.G. Sendra [et al.] // *Cell Rep.* – 2020. Vol – 32, № 9. – P. 108099.
106. Jang J.H. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp / J.H. Jang, H.W. Shin, J.M. Lee [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 794143.

107. Jin X.Y. [A clinical investigation of rHuIFN alpha-1 in the treatment of herpes simplex virus keratitis] / X.Y. Jin // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* (Китайская Народная Республика). – 1992. – Vol. 28, № 3. – P. 134-137.
108. Kaneko H. The quantitative detection of herpes simplex virus, varicella zoster virus, and cytomegalovirus DNAs in recipient corneal buttons / H. Kaneko, S. Higaki, M. Fukuda [et al.] // *Cornea*. – 2010. – Vol. 29. – P. 1436-1439.
109. Kaufman H.E. Ganciclovir ophthalmic gel 0.15%: safety and efficacy of a new treatment for herpes simplex keratitis / H.E. Kaufman, W.H. Haw // *Curr. Eye Res.* – 2012. – Vol. 37, № 7. – P. 654-660.
110. Kawasaki T. Toll-like receptor signaling pathways / T. Kawasaki, T. Kawai // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 461.
111. Kaye S. Herpes simplex keratitis / S. Kaye, A. Choudhary // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 355-380.
112. Kaye S.B. Evidence for herpes simplex viral latency in the human cornea / S.B. Kaye, C. Lynas, A. Patterson [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 1991. – Vol. 75, № 4. – P.195-200.
113. Kaye S.B. Human herpesviruses in the cornea / S.B. Kaye, K. Baker, R. Bonshek [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2000 – Vol. 84, № 6. – P. 563-571.
114. Kaye S.B. Ocular shedding of herpes simplex virus / S.B. Kaye, N. Madan, T.C. Dowd [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 1990. – Vol. 74, № 2. – P. 114-116.
115. Khalili M.R. Herpetic epithelial keratitis after intravitreal injection of bevacizumab (avastin) / M.R. Khalili, M. Mehdizadeh, M. Mehryar // *Cornea*. – 2009. – Vol. 28, № 3. – P. 360-361.
116. Kimberlin D.W. Antiviral therapy of HSV-1 and -2 / D.W. Kimberlin, R.J. Whitley. In: A. Arvin, G [et al.] // *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press. – 2007. – Chapter 64.
117. Kobayashi R. Herpes Simplex Virus 1 Small Capsomere-Interacting Protein VP26 Regulates Nucleocapsid Maturation / R. Kobayashi, A. Kato, H. Sagara [et al.] // *J. Virol.* – 2017. – Vol. 91, № 18 – P. e01068-17.

118. Koganti R. Current and Emerging Therapies for Ocular Herpes Simplex Virus Type-1 Infections / R. Koganti, T. Yadavalli, D. Shukla // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7, № 10. – P. 429.
119. Koujah L. Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea / L. Koujah, R.K. Suryawanshi, D. Shukla // *Cell Mol. Life Sci.* – 2019. – Vol. 76, № 3. – P. 405-419.
120. Kuffova L. High-risk corneal graft rejection in the setting of previous corneal herpes simplex virus (HSV)-1 infection / L. Kuffova, J.E. Knickelbein, T. Yu // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2016. – Vol. 57, № 4. – P. 1578-1587.
121. Kurt-Jones E.A. Innate Immune Mechanisms and Herpes Simplex Virus Infection and Disease / E.A. Kurt-Jones, M.H. Orzalli, D.M. Knipe // *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* – 2017. – Vol. 223. – P. 49-75.
122. Lane W.C. The Efficacy of the Interferon Alpha/Beta Response versus Arboviruses Is Temperature Dependent / W.C. Lane, M.D. Dunn, C.L. Gardner [et al.] // *mBio*. – 2018. – Vol. 9, № 2. – P. e00535-18.
123. Lee A.J. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons / A.J. Lee, A.A. Ashkar // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2061.
124. Lee B.L. Trafficking of endosomal Toll-like receptors / B.L. Lee, G.M. Barton // *Trends Cell Biol.* – 2014. – Vol. 24, № 6. – P. 360-369.
125. Lee C.C. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function / C.C. Lee, A.M. Avalos, H.L. Ploegh // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12, № 3 – P. 168-179.
126. Lee S.Y. Comparative analysis of polymerase chain reaction assay for herpes simplex virus 1 detection in tear / S.Y. Lee, M.J. Kim, M.K. Kim [et al.] // *Korean J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 27, № 5. – P. 316-321.
127. LeGoff J. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory / J. LeGoff, H. Péré, L. Bélec // *Virol. J.* – 2014. – Vol. 11. – P. 83.
128. Leifer C.A. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling / Leifer C.A., Medvedev A.E. // *J. Leukoc. Biol.* – 2016. – Vol. 100, № 5. – P. 927-941.

129. Lemaitre B. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults / B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut [et al.] // *Cell*. – 1996. – Vol. 86, № 6. – P. 973-983.
130. Liermann K. Evaluation of commercial herpes simplex virus IgG and IgM enzyme immunoassays / K. Liermann, A. Schäfler, A. Henke [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2014. – Vol.199. – P. 29-34.
131. López de Padilla C.M. The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases / C.M. López de Padilla, T.B. Niewold // *Gene*. – 2016. – Vol. 576 (1 Pt 1). – P.14-21.
132. Ma J.X. Real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of necrotizing herpes stromal keratitis / J.X. Ma, L.N. Wang, R.X. Zhou [et al.] // *Int. J. Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 9, № 5. – P. 682-686.
133. Ma Y. Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond / Y. Ma, B. He // *J. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 426, № 6. – P. 1133-1147.
134. Madhavan H.N. Laboratory methods in the detection of herpes simplex virus (HSV) in keratitis--a 9-year study including polymerase chain reaction (PCR) during last 4 years / H.N. Madhavan, K. Priya, J. Malathi [et al.] // *Indian J. Pathol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 46, № 1. – P.109-112.
135. Maglione P.J. Toll-like receptor signaling in primary immune deficiencies / P.J. Maglione, N. Simchoni, C. Cunningham-Rundles // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2015. – Vol. 1356, № 1. – P. 1-21.
136. McClure R. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens / R. McClure, P. Massari // *Front Immunol.* – 2014. Vol. 5. – P. 386.
137. McGilligan V.E. A comparison of the clinical and molecular diagnosis of herpes simplex keratitis / V.E. McGilligan, J.E. Moore, M. Tallouzi [et al.] // *Open J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 4, № 3. – P. 65-74.
138. Medzhitov R. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity / R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C.A. Jr. Janeway // *Nature*. – 1997. – Vol. 388, № 6640. – P. 394-397.

139. Menachery V.D. Control of herpes simplex virus replication is mediated through an interferon regulatory factor 3-dependent pathway / V.D. Menachery, D.A. Leib // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83, № 23. – P. 12399-12406.
140. Miner J.J. HSV-1 and Zika Virus but Not SARS-CoV-2 Replicate in the Human Cornea and Are Restricted by Corneal Type III Interferon / J.J. Miner, D.J. Platt, C.M. Ghaznavi [et al.] // *Cell Rep.* – 2020. – Vol. 33, № 5. – P. 108339.
141. Moffatt S.L. Centennial review of corneal transplantation / S.L. Moffatt, V.A. Cartwright, T.H. Stumpf // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 33, № 6. – P. 642-657.
142. Mohni K.N. Efficient herpes simplex virus 1 replication requires cellular ATR pathway proteins / K.N. Mohni, A.R. Dee, S. Smith [et al.] // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 1. – P. 531-542.
143. Moll H.P. The differential activity of interferon- α subtypes is consistent among distinct target genes and cell types / H.P. Moll, T. Maier, A. Zommer [et al.] // *Cytokine.* – 2011. – Vol. 53, № 1. – P. 52-59.
144. Mossman K.L. Herpesviruses and the innate immune response / K.L. Mossman, A.A. Ashkar // *Viral Immunol.* – 2005. – Vol. 18, № 2. – P. 267-281.
145. Nallar S.C. Interferons, Signal Transduction Pathways, and the Central Nervous System / S.C. Nallar, D.V. Kalvakolanu // *J. of Interferon Cytokine Res.* – 2014. – Vol. 34, № 8. – P. 559-576.
146. Neufeld M.V. Identification of a herpes simplex virus-induced dendrite in an eye-bank donor cornea / M.V. Neufeld, T.L. Steinemann, L.M. Merin [et al.] // *Cornea.* – 1999. – Vol. 18, № 4. – P. 489- 492.
147. Nguyen N.X. Long-term topical steroid treatment improves graft survival following normal-risk penetrating keratoplasty / N.X. Nguyen, B. Seitz, P. Martus [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 144, № 2. – P. 318-319.
148. Nilsen N.J. A role for the adaptor proteins TRAM and TRIF in toll-like receptor 2 signaling / N.J. Nilsen, G.I. Vladimer, J. Stenvik [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 6. – P. 3209-3222.

149. Ojala P.M. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro / P.M. Ojala, B. Sodeik, M.W. Ebersold [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 20, № 13. – P. 4922-4931.
150. Oliva M.S. Turning the tide of corneal blindness / M.S. Oliva, T. Schottman, M. Gulati // *Indian J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 60, № 5. – P. 423-427.
151. Paludan S.R. Recognition of herpesviruses by the innate immune system / S.R. Paludan, A.G. Bowie, K.A. Horan [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 143-154.
152. Park G.B. TLR3/TRIF signalling pathway regulates IL-32 and IFN- β secretion through activation of RIP-1 and TRAF in the human cornea / G.B. Park, D.Y. Hur, Y.S. Kim [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2015. – Vol. 19, № 5. – P. 1042-1054.
153. Patel M.C. Novel drugs targeting Toll-like receptors for antiviral therapy / M.C. Patel, K.A. Shirey, L.M. Pletneva [et al.] // *Future Virol.* – 2014. – Vol. 9, № 9. – P. 811-829.
154. Pramod N.P. Polymerase chain reaction in the diagnosis of herpetic keratitis: experience in a developing country / N.P. Pramod, S.P. Thyagarajan, K.V. Mohan [et al.] // *Can. J. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 35, № 3. – P.134-140.
155. Qu J.H. Loss of endothelial cells in viral DNA-positive grafts after keratoplasty: a 2-year follow-up study / J.H. Qu, R.M. Peng, G.G. Xiao [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2020. – №. [bjophthalmol-2020-317629](https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-317629).
156. Rasmussen S.B. Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production / S.B. Rasmussen, S.B. Jensen, C. Nielsen, [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2009. – Vol. 90 (Pt 1). – P. 74-78.
157. Reed L. A simple method of estimating 50% endpoints / L. Reed, H. Muench // *Amer. J. Hygiene.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
158. Remeijer L. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation / L. Remeijer, J. Maertzdorf, P. Doornenbal [et al.] // *Lancet.* – 2001. – Vol. 357, № 9254. – P. 442.

159. Remeijer L. Newly acquired herpes simplex virus keratitis after penetrating keratoplasty / L. Remeijer, P. Doornenbal, A.J. Geerards [et al.] // *Ophthalmology*. – 1997. – Vol. 104, № 4. – P. 648-652.
160. Resnikoff S. Global data on visual impairment in the year 2002 / S. Resnikoff, D. Pascolini, D. Etya'ale [et al.] // *Bull. World Health Organ*. – 2004. – Vol. 82, № 11. – P. 844-851.
161. Rezende R.A. New onset of herpes simplex virus epithelial keratitis after penetrating keratoplasty / R.A. Rezende, U.B. Uchoa, I.M. Raber [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 137, № 3. – P. 415-419.
162. Robert P.Y. [Herpesviruses serologic survey of corneal allograft recipients] / P.Y. Robert, J.P. Adenis, F. Denis [et al.] // *J. Fr. Ophtalmol [Франция]*. – 2006. – Vol. 29, № 3. – P. 259-263.
163. Robert P.Y. [How "safe" is corneal transplantation? A contribution on the risk of HSV-transmission due to corneal transplantation] / P.Y. Robert, J.P. Adenis, U. Pleyer // *Klin. Monbl. Augenheilkd [Германия]*. – 2005. – Vol. 222, № 11. – P. 870-873.
164. Robinson N. Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / N. Robinson, S. McComb, R. Mulligan [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13, № 10. – P. 954-962.
165. Rolinski J. Immunological aspects of acute and recurrent herpes simplex keratitis / J. Rolinski, I. Hus // *J. Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 513560.
166. Rowe A.M. Herpes keratitis / A.M. Rowe, A.J. St Leger, S. Jeon [et al.] // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2013. – Vol. 32. – P. 88–101.
167. Sainz B. Jr. Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1 / B. Jr. Sainz, W.P. Halford // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, № 22. – P. 11541-11550.
168. Saito M. Centrifugation-Controlled Thermal Convection and Its Application to Rapid Microfluidic Polymerase Chain Reaction Devices / M. Saito, K. Takahashi, Y. Kiriyaama [et al.] // *Anal. Chem.* – 2017. – Vol. 89, № 23. – P. 12797-12804.

169. Sarnicola V. Deep anterior lamellar keratoplasty in herpes simplex corneal opacities / V. Sarnicola, P. Toro // *Cornea*. – 2010. – Vol 29, № 1. – P. 60-64.
170. Satpathy G. Evaluation of tear samples for Herpes Simplex Virus 1 (HSV) detection in suspected cases of viral keratitis using PCR assay and conventional laboratory diagnostic tools / G. Satpathy, A.K. Mishra, R. Tandon [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 95, № 3. – P. 415-418.
171. Seitzman G.D. Rose bengal and lissamine green inhibit detection of herpes simplex virus by PCR / G.D. Seitzman, V. Cevallos, T.P. Margolis // *Am. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 141, № 4. – P. 756-758.
172. Shimizu E. Corneal Higher-order Aberrations and Visual Improvement Following Corneal Transplantation in Treating Herpes Simplex Keratitis / E. Shimizu, T. Yamaguchi, D. Tomida [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 184. – P. 1-10.
173. Skarentzos K. Corneal Graft Success Rates in HSV Keratitis: A Systematic Review / K. Skarentzos, E. Chatzimichael, E.K. Panagiotopoulou [et al.] // *Acta Medica (Hradec Kralove)*. – 2020. – Vol. 63, № 4. – P. 150-158.
174. Smith S. Structure of the herpes simplex virus 1 genome: manipulation of nicks and gaps can abrogate infectivity and alter the cellular DNA damage response / S. Smith, N. Reuven, K.N. Mohni [et al.] // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, № 17. – P. 10146-10156.
175. Stoeger T. "Novel" Triggers of Herpesvirus Reactivation and Their Potential Health Relevance / T. Stoeger, H. Adler // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 3207.
176. Su C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update / C. Su, G. Zhan, C. Zheng // *Virol. J.* – 2016. – Vol. 13. – P. 38.
177. Subhan S. Diagnosis of herpes simplex virus-1 keratitis: comparison of Giemsa stain, immunofluorescence assay and polymerase chain reaction / S. Subhan, R.J. Jose, A. Duggirala [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 2004. – Vol. 29, № 2-3. – P. 209-213.

178. Subramanian G. A new mechanism of interferon's antiviral action: Induction of autophagy, essential for paramyxovirus replication, is inhibited by the interferon stimulated gene, TDRD7 / G. Subramanian, T. Kuzmanovic, Y. Zhang [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2018. – Vol. 14, № 1. – P. e1006877.
179. Takeda K. TLR signaling pathways / K. Takeda, S. Akira // *Semin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, № 1. – P. 3-9.
180. Taravati P. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology / P. Taravati, D. Lam, R.N. Van Gelder // *Curr. Ophthalmol. Rep.* – 2013. – Vol. 1, № 4 – P. 10.1007/s40135-013-0025-1.
181. Teijaro J.R. Type I interferons in viral control and immune regulation / J.R. Teijaro // *Curr. Opin. Virol.* – 2016. – Vol. 16. – P. 31-40.
182. Thomas J. On the Essential Involvement of Neutrophils in the Immunopathologic Disease: Herpetic Stromal Keratitis / J. Thomas, S. Gangappa, S. Kanangat [et al.] // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158, № 3 – P. 1383-1391.
183. Thouvenot D. [Management of mucocutaneous herpes simplex virus infections in immunocompetent patients: signification and limits of antigen detection culture methods and antibody detection] / D. Thouvenot, F. Morfin // *Ann. Dermatol. Venereol [Франция]*. – 2002 – Vol. 129 (4 Pt 2). – P. 609-619.
184. Toriyama K. Necrotizing Keratitis Caused by Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus / K. Toriyama, T. Inoue, T. Suzuki [et al.] // *Case Reports in Ophthalmology.* – 2014. – №. 5. – P. 325-328.
185. Tullo A. Pathogenesis and management of herpes simplex virus keratitis / A. Tullo // *Eye (Lond.)*. – 2003. – Vol. 17, № 8. – P. 919-922.
186. Ueta M. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines / M. Ueta, J. Hamuro, H. Kiyono [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 331, № 1. – P. 285-294.
187. Verstak B. The TLR signaling adaptor TRAM interacts with TRAF6 to mediate activation of the inflammatory response by TLR4 / B. Verstak, J. Stack, T. Ve [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2014. – Vol. 96, № 3. – P. 427-436.

188. Vogel K. Both plasmacytoid dendritic cells and monocytes stimulate natural killer cells early during human herpes simplex virus type 1 infections / K. Vogel, S. Thomann, B. Vogel [et al.] // *Immunology*. – 2014. – Vol. 143, № 4. – P. 588-600.
189. Vollstedt S. Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1 / S. Vollstedt, S. Arnold, C. Schwerdel [et al.] // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78, № 8. – P. 3846-3850.
190. Wang L. Pathogenesis of Herpes Stromal Keratitis: Immune Inflammatory Response Mediated by Inflammatory Regulators / L. Wang, R. Wang, C. Xu [et al.] // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 766.
191. Weber C. Toll-like receptor (TLR) 3 immune modulation by unformulated small interfering RNA or DNA and the role of CD14 (in TLR-mediated effects) / C. Weber, C. Müller, A. Podszuweit [et al.] // *Immunology*. – 2012. – Vol. 136, № 1. – P. 64-77.
192. Wilhelmus K.R. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis / K.R Wilhelmus // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2015. – № 1, P. CD002898.
193. Wilhelmus K.R. The treatment of herpes simplex virus epithelial keratitis / K.R. Wilhelmus // *Trans. Am. Ophthalmol Soc.* – 2000. – Vol. 98. – P. 505-532.
194. Williams K.A. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian Corneal Graft Register / K.A. Williams, S.M. Muehlberg, R.F. Lewis [et al.] // *Eye (Lond.)*. – 1995. – Vol. 9 (Pt 2). – P. 219-227.
195. Wilson S.E. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency / S.E. Wilson // *Exp. Eye Res.* – 2012. – Vol. 99, № 1. – P. 78-88.
196. Wisner T.W. Anterograde transport of herpes simplex virus capsids in neurons by both separate and married mechanisms / T.W. Wisner, K. Sugimoto, P.W. Howard [et al.] // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85, № 12. – P. 5919-5928.
197. Xiao S. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives / S. Xiao, Z. Tian, Y. Wang [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2018. – Vol. 38, № 3. – P. 951-976.

198. Xie P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases / P. Xie // *J. Mol. Signal.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 7.
199. Yao Y.F. Clinical characteristics of acyclovir-resistant herpetic keratitis and experimental studies of isolates / Y.F. Yao, Y. Inoue, T. Kase [et al.] // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 1996. – Vol. 234 (Suppl 1). – P. S126–S132.
200. Zhang S. Clinical consequences of herpes simplex virus DNA in donor corneas: Different prognosis and management of endothelial keratoplasty and deep anterior lamellar keratoplasty / S. Zhang, G. Xiao, R.M. Peng [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2020. – Vol. 129. – P. 104508.
201. Zhang W. Dendritic keratitis caused by an acyclovir-resistant herpes simplex virus with frameshift mutation / W. Zhang, T. Suzuki, A. Shiraishi [et al.] // *Cornea.* – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 105-106.
202. Zhao J. Herpes Simplex Virus and Pattern Recognition Receptors: An Arms Race / J. Zhao, C. Qin, Y. Liu [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 613799.
203. Zhao J. Recent advances on viral manipulation of NF- κ B signaling pathway / J. Zhao, S. He, A. Minassian [et al.] // *Curr. Opin. Virol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 103-111.
204. Zheng X. Reactivation and donor-host transmission of herpes simplex virus after corneal transplantation / X. Zheng // *Cornea.* – 2002. – Vol. 21, № 7S. – P. 90–93.