

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена на базе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России.

Научный руководитель:

Борзенко Сергей Анатольевич -

доктор медицинских наук, академик РАЕН, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, заведующий Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Ченцова Екатерина Валериановна -

доктор медицинских наук, профессор, начальник отдела Травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Минина Марина Геннадьевна -

доктор медицинских наук, профессор, заведующая Московским координационным центром органного донорства (МКЦОД).

Ведущая организация: ФГБНУ «НИИГБ».

Защита состоится «__» _____ 2021 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.21.1.021.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д.59 А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Мушкова Ирина Альфредовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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; Борзенок 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 приживание трансплантата, вплоть до развития реакции тканевого отторжения (Борзенок 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, активирует 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.

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.

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.).

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Первый этап

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

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 в данной диссертационной работе осуществлялся на основании классификации трансплантабельности – морфофункциональной оценки, которая включает биомикроскопическую характеристику и адреналиновую скрининг-пробу, предложенные С.А. Борзенком. К первому этапу исследования были допущены роговицы с показателями 1А, 1В, 1С (нетрансплантабельные роговицы) по классификации трансплантабельности. Роговично-склеральные диски выкраивались в операционной Глазного тканевого банка в соответствии с «Алгоритмом заготовки трупных роговиц человека для трансплантации». 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 ПЦР для обнаружения ВПГ-1.

Второй этап

На втором этапе исследования проводилась разработка раствора для вирусной деконтаминации донорских роговиц.

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, приоритет от 26.02.1992 г.).

Для получения противовирусного эффекта, при сохранении консервационных свойств, требовалось адаптировать имеющуюся среду к органотипическому культивированию (37 °С). В связи с этим подбирались оптимальная концентрация хондроитин-сульфата А и декстрана. Необходимость повышения температуры консервации до 37-38 °С обусловлена диапазоном температурной активности противовирусных звеньев врожденного иммунитета и термолабильностью ВПГ-1.

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

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

Третий этап

На третьем этапе работы изучалось влияние предлагаемой технологии на морфометрические характеристики, жизнеспособность, функциональную активность, фенотипическую характеристику и микростроение клеток заднего

эпителия, являющихся важнейшим звеном в поддержании гомеостаза роговицы. Оценивалась стерильность предложенного консервационного раствора.

Исследовались 30 глаз от 15 доноров-трупов. Согласно классификации трансплантабельности, роговицы имели показатели 2А и 2В (трансплантабельные роговицы). Заготовленные роговично-склеральные диски ($D = 16$ мм, $n = 30$) помещали во флаконы с раствором для хранения роговицы и подвергали гипотермической консервации при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Спустя сутки оценивались исходные морфометрические характеристики эндотелиальных клеток (плотность эндотелиальных клеток (ПЭК), площадь и показатель гексагональности).

Затем роговично-склеральные диски опытной группы консервировали в растворе для вирусной деконтаминации при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, которая активирует синтез эндогенных интерферонов. Роговично-склеральные диски контрольной группы хранились в гипотермических условиях, согласно базисной технологии заготовки трупных роговиц человека для трансплантации. Спустя сутки оценивали морфометрические характеристики эндотелиальных клеток в обеих группах.

Далее роговично-склеральные диски опытной группы переносили в раствор для хранения роговицы и консервировали при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Спустя сутки в обеих группах оценивали изменения морфометрических характеристик эндотелиальных клеток, после чего хранили при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до окончания эксперимента (до 6 суток).

Образцы использованных растворов для вирусной деконтаминации направлялись на исследование стерильности, и, дополнительно, вместе с образцами растворов для хранения роговицы контрольной группы, подвергались иммуноферментному анализу на содержание интерферонов 1 типа (интерферона- α и интерферона- β) на третьем этапе работы.

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 клеток заднего эпителия роговицы.

Четвертый этап

На данном этапе работы на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в эксперименте *in vitro* изучались аспекты цитотоксического действия и противовирусной эффективности разработанного раствора. В качестве опытного образца выступал предложенный раствор для вирусной деконтаминации, в качестве контрольного – раствор для хранения роговицы.

Цитотоксическое действие опытных и контрольных образцов консервационных растворов оценивали по их влиянию на морфологию и жизнеспособность культур клеток Vero в процессе культивирования. Маркерами цитотоксического действия являлись характерные цитодеструктивные и морфологические изменения в клеточном монослое.

Оценка противовирусной активности разработанного раствора проводилась по стандартной методике в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета Минздрава России.

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, выражая в логарифмических единицах (\lg ТЦИД₅₀/0,1 мл).

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.

Вирусингибирующий эффект исследуемых растворов оценивали по: снижению уровня накопления вируса под воздействием консервационного раствора, коэффициенту ингибирования. Для получения достоверных результатов исследования данного этапа работы проводились в трех повторах.

Пятый этап

На данном этапе работы оценивались иммуномодулирующие качества предложенного раствора. Проводилась количественная оценка уровней синтезированных эндогенных интерферонов.

Исследование проводилось на 30 стромальных дисках, выделенных в процессе заготовки трансплантатов для задней послойной кератопластики из 15 роговиц от 15 доноров-трупов. Из каждой роговицы были получены 2 стромальных диска. Один из стромальных дисков использовался для получения кератоцитов, оставшийся – для получения фибробластов. Согласно классификации трансплантабельности, склеральные диски были выделены из роговиц с показателем 3А (трансплантабельные роговицы).

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

Полученные клеточные культуры кератоцитов и фибробластов 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 собирали в отдельные стерильные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл для проведения анализа на содержание в них интерферонов. Образцы консервационных растворов с третьего этапа работы также исследовались на содержание в них интерферонов.

Фенотип полученных клеточных культур подтверждался в ходе иммуноцитохимического исследования.

Шестой этап

На данном этапе в эксперименте *in vitro* изучалась способность предлагаемой технологии оказывать противовирусный эффект на инфицированную вирусом простого герпеса 1 типа ткань роговицы.

Для проведения данной части исследования 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. Полученные роговицы разделялись на 2 равные части, одна из которых являлась опытным образцом, оставшаяся – контрольным образцом. Роговицы опытной группы консервировали по предлагаемой технологии. Роговицы контрольной группы консервировали по стандартной технологии. Спустя сутки роговицы исследовались методом ПЦР на содержание ВПГ-1.

Затем, в заключительном разделе работы, проводилась вирусная деконтаминация трупных донорских роговиц Глазного тканевого банка. Исследовались жизнеспособные роговицы ($n = 18$) с показателями по классификации трансплантабельности 1А, 1В (нетрансплантабельные роговицы), в эпителии которых содержался ВПГ-1, верифицированный методом ПЦР.

В ходе стандартного технологического процесса заготовки роговиц забирались соскобы роговичного эпителия, который исследовался при помощи ПЦР на наличие ВПГ-1. 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ

Результаты первого этапа

В данном разделе представлены результаты эпидемиологического исследования по обнаружению вируса простого герпеса 1 типа в донорском материале глазного тканевого банка.

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 второго этапа

В данном разделе представлены результаты разработки консервационного раствора 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.

Противовирусный эффект созданного раствора обусловлен входящим в его состав аномальным нуклеозидом и индуктором интерферона. 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.

Задействовать естественные иммунологические противовирусные системы роговицы возможно благодаря особенностям её клеточного состава. Известна 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.

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.

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 ингибирующее воздействие на ВПГ-1, поскольку данный вирус является термолабильным (неустойчивым к температурному воздействию).

Консервационный эффект созданного раствора обусловлен базисной консервационной средой, которую предложили С.Н. Федоров, З.И. Мороз, С.А. Борзенко, Ю.А. Комах (патент РФ № 93010287). 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 1.

Таблица 1 – 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

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

Результаты третьего этапа

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. Результаты оценки плотности эндотелиальных клеток опытной и контрольной групп до 6 суток консервации представлены на рисунке 1.

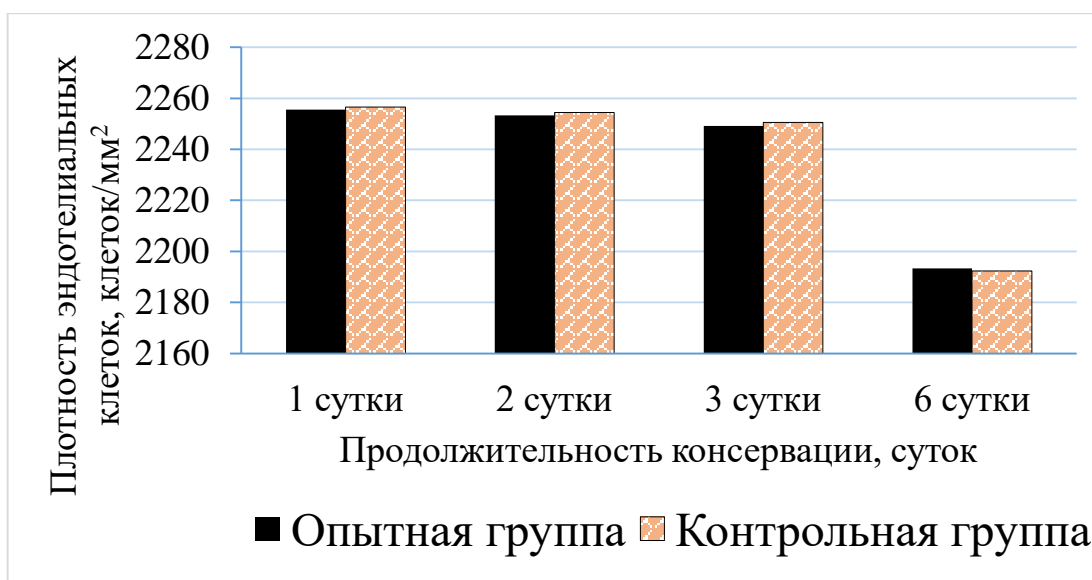


Рисунок 1 – Динамика изменения плотности эндотелиальных клеток трупных донорских роговиц в опытной и контрольной группах

К 6-м суткам консервации плотность эндотелиальных клеток в опытной группе составила $2193,27 \pm 31,62$ клетки/ мм^2 , в контрольной группе – $2192,33 \pm 25,91$ клетки/ мм^2 . По результатам проведенного статистического анализа по окончании консервации отсутствовала достоверная разница между группами в плотности, площади, и показателе гексагональности эндотелиальных клеток.

Оценка жизнеспособности заднего эпителия роговиц обеих групп проводилась в ходе иммуногистохимического исследования с использованием набора «Live and Dead». При помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии были получены изображения окрашенных клеток опытной и контрольной групп.

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

Оценка функциональной активности и фенотипической характеристики клеток заднего эпителия заключалась в изучении уровней экспрессии, соответственно, Na^+/K^+ -АТФазы и ZO-1 в ходе ИГХ. 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. При помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии были получены изображения экспрессии Na^+/K^+ -АТФазы и ZO-1 в опытной и контрольной группах.

В результате компьютерного анализа полученных изображений при помощи программного обеспечения «CellProfiler» установлено, что среднее значение экспрессии Na^+/K^+ -АТФазы в опытной и контрольной группах составило 0,0058 и 0,0056 относительных единиц, соответственно. Достоверных 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 и контрольной группах составляло 0,0047 и 0,0045 относительных единиц, соответственно. Достоверных отличий в экспрессии маркера плотных межклеточных контактов ZO-1 между группами также выявлено не было ($p > 0,05$).

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.

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 роста микроорганизмов.

Результаты четвертого этапа

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 ($p > 0,05$).

В результате оценки противовирусной эффективности разработанного раствора было установлено, что раствор для вирусной деконтаминации обладает выраженной противовирусной эффективностью в отношении ВПГ-1.

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 ТЦД₅₀/0,1 мл и $2,6 \pm 0,25$ lg ТЦД₅₀/0,1 мл. Схемы применения разработанного раствора статистически значимо не отличались между собой по уровню инфекционной активности, коэффициенту ингибирования и титру вируса ($p > 0,05$).

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 ($p < 0,05$).

Результаты пятого этапа

В эксперименте *in vitro* оценивалась способность клеточных культур кератоцитов, фибробластов, а также ткани роговицы к продукции собственного интерферона- β во время стимуляции индуктором интерферона. В ходе клеточного культивирования были получены культуры кератоцитов и фибробластов, фенотип которых подтверждался в ходе иммуноцитохимического анализа.

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. В то же время в культуре фибробластов определялась экспрессия характерных маркеров фибробластов – α -гладкомышечного актина и виментина, при отсутствии либо слабой экспрессии кератокана.

По результатам проведенного объективного анализа полученных изображений при помощи программного обеспечения «CellProfiler» было установлено, что 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 ($p < 0,05$).

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 ($p < 0,05$).

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 ($p < 0,05$).

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.

Результаты шестого этапа

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).

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 ($p < 0,05$).

По результатам проведенного количественного ПЦР-исследования ткани трупных донорских роговиц на присутствие ДНК ВПГ-1 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.

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 деkontаминации 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 работ, опубликованных по теме диссертации в ведущих
рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной
комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации**

- 1. Керимов Т.З. Герпесвирусная инфекция трансплантата роговицы: подходы к вирусной деконтаминации на этапе консервации / С.А. Борзенок, Н.А. Гаврилова, Х.Д. Тонаева // Практическая медицина. – 2017. – т. 03. – № 18. – С. 89-92.**
- 2. Борзенок, С.А. Роль вируса простого герпеса в приживлении донорской роговицы / Т.З. Керимов, Н.А. Гаврилова, Ю.Ю. Калинин [и др.] // Трансплантология. – 2020. – т. 12 – № 2. – С. 112-125.**
- 3. Алимбарова, Л.М. Изучение противовирусной активности жидких сред для хранения роговицы в отношении вируса простого герпеса *in vitro* / Т.З. Керимов, С.А Борзенок // Вопросы вирусологии. – 2020. – т. 65 – № 4. – С. 228-236.**
- 4. Керимов, Т.З. Патофизиологические механизмы иммунологической деконтаминации вируса простого герпеса 1 типа из роговицы / В.П. Соболев, М.А. Соболева, Н.А. Гаврилова [и др.] // Патогенез. – 2020. – т. 18 – № 3. – С. 4-11.**

Прочие публикации

- 5. Керимов, Т.З. Антивирусная деконтаминация трансплантатов донорских роговиц на этапе консервации / С.А Борзенок // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – «Трансплантация и донорство органов». // М.; – 2017. – т. XIX. – С. 221.**
- 6. Керимов, Т.З. Изменение плотности эндотелиальных клеток роговицы в ходе вирусной деконтаминации / А.А. Желтоножко, С.А. Борзенок, Ю.Ю. Калинин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019 –. т. 21. – № 5. – С. 152.**

7. Керимов, Т.З. Оценка эндотелия трупных донорских роговиц методом сканирующей электронной микроскопии после вирусной деконтаминации в консервационном растворе / М.Х. Хубецова, А.А. Желтоножко, С.А. Борзенко [и др.] // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – т. 4 – № 35. – С. 255-256.
8. Борзенко, С.А. Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток трупных донорских роговиц после вирусной деконтаминации / Т.З. Керимов, Н.А. Гаврилова, М.Х. Хубецова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – т. 22. – № 5. – С. 134.

Изобретения по теме диссертации

- 1. Патент № 2674585 Российская Федерация, А01N 1/02 (2006.01); А01N 1/02 (2018.08).** Средство для консервации донорской роговицы : № 2017138927 : заявл. 09.11.2017 : опубл. 11.12.2018 / Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Тонаева Х.Д., Керимов Т.З., Гаврилова Н.А., Измайлова С.Б., Ковшун Е.В.; заявитель и патентообладатель ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России.
- 2. Патент РФ № 2745114 Российская Федерация, А01N 1/02 (2006.01); А01N 1/02 (2020.08).** Средство для органотипической консервации донорской роговицы : № 2020126934 : заявл. 12.08.2020 : опубл.: 22.03.2021 / Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Керимов Т.З., Измайлова С.Б., Гаврилова Н.А., Калинин Ю.Ю., Комах Ю.А., Хубецова М.Х.; заявитель и патентообладатель ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России.

Список сокращений

ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ВПГ-1	вирус простого герпеса 1 типа
СКП	сквозная кератопластика
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭК	плотность эндотелиальных клеток
ИФН	интерферон
ИФА	иммуноферментный анализ
ИЦХ	иммуноцитохимический анализ
ЦПД	цитопатическое действие
TLR	Толл-подобные рецепторы