

## ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ДОНОРСКОГО МАТЕРИАЛА ВИРУСАМИ ГРУППЫ ГЕРПЕСА КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНИ ТРАНСПЛАНТАТА ПРИ СКВОЗНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКЕ

*Миронкова Е.А.<sup>1</sup>, Макаров П.В.<sup>1</sup>, Слепова О.С.<sup>1</sup>, Гундорова Р.А.<sup>1</sup>, Кугушева А.Э.<sup>2</sup>, Демкин В.В.<sup>2</sup>, Садохина Т.С.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, г. Москва

<sup>2</sup> Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва

В работе представлены результаты ПЦР-диагностики, направленной на обнаружение ДНК вирусов группы герпеса (ВГЧ 1,2, ВЭБ, ВГЧ 6,7) ткани донорской роговицы, взятой во время операции сквозной кератопластики (СКП). Под наблюдением находились 46 больных (глаз), перенесшие операцию сквозной кератопластики (СКП). Сроки наблюдения больных после СКП – от 14 дней до 12 месяцев.

ПЦР-исследование фрагментов донорской роговицы выявило наличие ДНК вирусов группы герпеса в 21,7%. Ретроспективный анализ показал, что при наличии ДНК вирусов группы герпеса в роговице донора риск развития послеоперационных осложнений и помутнения кератотрансплантата повышается в 2–3 раза, достигая 100 и 70% соответственно. При этом высокий риск неблагоприятных исходов сохраняется не только на фоне системной иммуносупрессивной терапии, которая обычно учитывается как предпосылка активизации хронических инфекций, но и при отсутствии таковой. Это дает основание заключить, что предоперационная подготовка донорского материала, особенно «свежих» роговиц, должна включать расширенную ПЦР-диагностику на вирусы группы герпеса и обязательную его выбраковку в случаях положительных тестов.

*Ключевые слова:* донорский материал для кератопластики, сквозная кератопластика.

## HERPES VIRUS CONTAMINATION OF DONOR'S TISSUE AS A POTENTIAL ETIOLOGY OF CORNEAL GRAFT DISEASE AFTER PENETRATING KERATOPLASTY

*Mironkova E.A.<sup>1</sup>, Makarov P.V.<sup>1</sup>, Slepova O.S.<sup>1</sup>, Gundorova R.A.<sup>1</sup>, Kugusheva A.E.<sup>2</sup>, Demkin V.V.<sup>2</sup>, Sadokhina T.S.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> The Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow

<sup>2</sup> Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Science, Moscow

We present the study of outcomes of PCR-diagnostics directed on detection of DNA of herpes-family viruses in donor's corneal tissues taken during penetrating keratoplasty (PK). In total, there were 46 patients, who underwent PKs. They were followed up from 14 days till 12 months. PCR-research of fragments of a donor cornea revealed existence of DNA in 21.7%. The retrospective analysis showed that in the presence of herpes-virus DNA in donor's cornea is the risk factor of postoperative complications development and increases the rejection rate 2–3 times, reaching 100% – 70%. Thus the high risk of graft failures remains associated not only with the system immunosuppressive therapy which is usually considered as the precondition of activation of chronic infections, but also in the absence of that. It gives the ground to conclude that preoperative preparation of a donor material, especially «fresh» corneas, should include expanded PCR-diagnostics on herpes-viruses and its obligatory discarding in cases of positive tests.

*Key words:* donor's corneal tissue, penetrating keratoplasty.

*Статья поступила в редакцию 4.10.12 г.*

**Контакты:** Миронкова Елена Александровна, к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии  
**Тел.** +7-916-138-75-98, **e-mail:** medaxa@mail.ru

Получение качественного донорского материала остается одной из основных проблем кератопластики. Огромное значение имела разработанная в 1930-е годы академиком В.П. Филатовым методика консервации донорской трупной роговицы. Работы офтальмологов McCarey и Kaufman позволили создать в 1974 г. среду «МК», которая дала возможность обеспечить надежную консервацию роговицы до 96 часов. Вместе с тем в клиниках России при сквозной кератопластике (СКП) часто применяется так называемый «свежий» донорский материал (до 24 часов после смерти донора), что во многом обусловлено нехваткой высокооснащенных банков роговицы. В то же время «свежий» материал имеет неоспоримое преимущество в плане жизнеспособности клеток эпителия и эндотелия роговицы.

Существуют принятые во всем мире противопоказания для использования донорского материала (смерть донора от инфекционных заболеваний, злокачественных новообразований, от неизвестной причины и др.). Качество трансплантата для СКП определяется с помощью биомикроскопии и эндотелиальной микроскопии роговицы. Для предотвращения трансмиссионного заражения реципиента кровь донора проверяют на инфицированность вирусами гепатита В и С, ВИЧ, сифилисом [1, 4]. Однако сам донорский материал на маркеры каких-либо инфекций обычно не исследуется, хотя в литературе имеются сообщения о случаях инфицированности кадаверных роговиц указанными выше вирусами [5, 6], а также единичные публикации о присутствии в пересаженном трансплантате ДНК вируса простого герпеса [7, 8].

**ЦЕЛЬ**

Исследование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) роговиц донора и удаленной при рекератопластике ткани на вирусы группы герпеса и изучение их влияния на исход операции пересадки роговицы.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Под наблюдением находились 46 больных (глаз), перенесшие операцию сквозной кератопластики (СКП) по поводу: воспалительных осложнений, включая язвы и перфорации роговицы (20), послеожоговых бельм (9), эпителиально-эндотелиальной дистрофии (8), трофических язв (6) и последствий проникающей травмы (3). На 24 глазах СКП была проведена впервые, на 22 – во второй (17 глаз) или третий (5 глаз) раз. Сроки наблюдения больных после СКП (по числу глаз): 1–2 мес. – 6 (13,1%), 3–5 мес. – 10 (21,7%), 6–12 мес. – 11 (23,9%), более 1 года – 19 (41,3%).

Для пересадки были использованы «свежие» роговицы доноров. При обязательной предоперационной биомикроскопии признаков патологии или каких-либо других дефектов в них обнаружено не было («подозрительный» донорский материал выбраковывался).

В послеоперационном периоде всем пациентам проводили стандартную противовоспалительную, иммуносупрессивную терапию. У 10 из 46 человек была использована системная иммуносупрессивная терапия с помощью циклоспорина А (ЦСА-Гексал) (*per os*, начальная доза 3 мг/кг веса пациента, продолжительность до 12 месяцев, уточнение дозы каждые 3 недели по результатам клинического и иммунологического исследования) [2].

Весь донорский материал (46 образцов), а также фрагменты ткани трансплантатов, удаленных во время рекератопластики (22 образца), были исследованы с помощью ПЦР на пять вирусов группы герпеса – вирус простого герпеса 1-го и 2-го типа (ВПГ 1 и 2), вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирус герпеса человека 6-го и 7-го типа (ВГЧ 6 и 7). Определение вирусной ДНК проводили методом гнездовой ПЦР NucleoSpin® Blood L (Macherey-Nagel, Германия). Забор фрагментов донорской роговицы производился в ходе операции, непосредственно после выкраивания трансплантата. Анализ зависимости исходов СКП от результатов ПЦР-диагностики проводился ретроспективно.

Статистическая обработка полученных данных проведена по системе «Биостат».

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

ПЦР-исследование фрагментов донорской роговицы выявило наличие ДНК вирусов группы герпеса в 10 из 46 образцов (21,7%) . В них обнаруживались все изучавшиеся вирусы (ВП 1,2 – 2,3% случаев; ВЭБ – 4,6%; ВГЧ 7 – 9,3%; ВГЧ 6 – 11,6%), при этом явно преобладала моноинфекция (9 из 46 проб; 19,6%) (рис. 1). Ранее при аналогичном исследова-

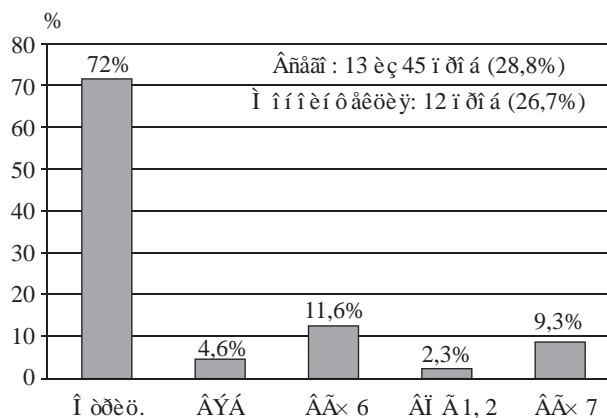


Рис. 1. Частота выявления ДНК вирусов группы герпеса во фрагментах донорских роговиц

нии роговицы у реципиентов [3] присутствие ДНК тех же вирусов мы обнаружили в 32 образцах из 81 (39,5%) и отметили, что в удаленной пораженной ткани выявлялись как моно- так и микст-инфекция, причем с сопоставимой частотой (14 и 18 образцов; 17,3 и 22,2% соответственно).

Инфицированность удаленных при проведении повторной СКП патологически измененных кератотрансплантатов составила 31,8% (7 из 22 фрагментов), что можно объяснить изначальным присутствием в них ДНК вирусов герпеса. Вместе с тем нельзя исключить и вероятность эндогенного (повторного или первичного) инфицирования пересаженной донорской роговицы, особенно в условиях обострения хронических инфекций на фоне стресса (послеожогового, послеоперационного) и/или применения иммуносупрессивной терапии, в частности ЦСА [2]. Такой «двойной» риск обсуждается и в недавно опубликованной статье немецких исследователей [7].

Ретроспективный анализ результатов СКП в зависимости от наличия ДНК вирусов группы герпеса в роговице донора показал, что при положительных результатах ПЦР осложнения возникли практически во всех случаях (7 из 7 прослеженных в динамике; 100%), а помутнения трансплантата в 5 из 7 случаев (71,4%), тогда как при отрицательных показателях ПЦР, соответственно, в 13 (38,2%) и 4 (11,8%) из 34 прослеженных в динамике случаев, т. е. достоверно реже ( $p = 0,003$ ;  $p = 0,003$ ). Серьезных различий между двумя сравниваемыми группами в сроках появления (от 1–2 до 5–6 месяцев) и структуре осложнений (везде преобладали эрозии роговицы) мы не выявили, но все же отметили, что в первой группе эрозии, осложненные язвами, встречались вдвое чаще (2 из 7 случаев; 28,6%), чем во второй (5 из 34 случаев; 14,7%). Надо полагать, что при пересадке ПЦР-негативных трансплантатов неблагоприятное течение и исход послеоперационного периода были обусловлены другими этиопатогенетическими (и/или клиническими) факторами, что согласуется с современными представлениями о сложном механизме развития болезни кератотрансплантата.

Анализ полученных данных в зависимости от применения ЦСА показал, что при отсутствии ДНК вирусов герпеса в роговице доноров активная иммуносупрессивная терапия сопровождалась развитием осложнений в 2 из 9 случаев (22,2%); если же препарат не использовался – в 11 из 25 (44,0%). При пересадке ПЦР-положительного донорского материала, независимо от применения (1 чел.) или неприменения (6 чел.) ЦСА, практически во всех случаях (7 из 7; 100%) наблюдалось неблагоприятное течение послеоперационного периода и в 5 из 7 случаев – помутнение трансплантата (70%). В целом эти наблю-

дения заставляют прийти к выводу о том, что пересадка донорской роговицы, инфицированной вирусом герпеса, обуславливает неудачу хирургического лечения, независимо от применения или неприменения системной иммуносупрессии.

## КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР

*Больной Г., 1979 г. р., диагноз: OD – поствоспалительное бельмо роговицы (рис. 2). Операция на OD – субтотальная сквозная кератопластика; донором явилась женщина 39 лет, причина смерти – автотравма. ПЦР-исследование выявило наличие ДНК ВГЧ-6 в донорской роговице (ретроспективно). В послеоперационном периоде (4 месяца) развилась обширная эрозия трансплантата, выраженный отек лоскута (рис. 3). Рекератопластика проведена через 6 месяцев после первой СКП (рис. 4). При ПЦР-исследовании иссеченного фрагмента роговицы реципиента выявлено наличие ДНК ВГЧ-6.*

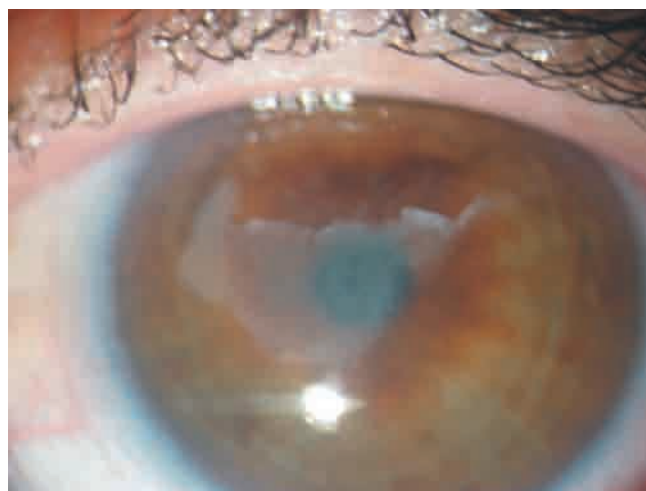


Рис. 2. Больной Г., 1979 г. р., диагноз: OD – поствоспалительное бельмо роговицы



Рис. 3. Четыре месяца после операции – эрозия, отек и помутнение трансплантата





Рис. 4. 8-е сутки после реСКП



Рис. 5. 18 месяцев после реСКП

При повторной СКП донор – мужчина 42 лет, причина смерти – субдуральная гематома, отек мозга. При ПЦР-исследовании ДНК вирусов группы герпеса в донорской роговице не обнаружены. Послеоперационный период без осложнений. Спустя 18 месяцев после рекератопластики трансплантат прозрачен, поверхность флюоресцеином не окрашивается (рис. 5). Полученные результаты подтверждают, что наиболее благоприятный исход СКП, полное прозрачное приживление трансплантата возможно лишь в случае отсутствия ДНК вирусов группы герпеса в донорской роговице.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что при нали-

чии ДНК вирусов группы герпеса в роговице донора риск развития послеоперационных осложнений и помутнения кератотрансплантата повышается в 2–3 раза, достигая 100 и 70% соответственно. При этом высокий риск неблагоприятных исходов сохраняется не только на фоне системной иммуносупрессивной терапии, которая обычно учитывается как предпосылка активизации хронических инфекций, но и при отсутствии таковой. Это дает основание заключить, что предоперационная подготовка донорского материала, особенно «свежих» роговиц, должна включать расширенную ПЦР-диагностику на вирусы группы герпеса и обязательную его выбраковку в случаях положительных тестов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борзенок С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дис. ... докт. мед. наук. М., 2008. 266 с.
2. Слепова О.С., Быковская Г.Н., Макаров П.В. и др. Исследование эффективности применения циклоспорина у больных с высоким риском отторжения кератотрансплантата. Сообщение 2. Иммунологический контроль лечения // Вестник офтальмологии. 2007. № 4. С. 35–37.
3. Слепова О.С., МIRONKOVA E.A., Макаров П.В. и др. Инфицированность роговиц донора и/или реципиента вирусами группы герпеса как возможная причина развития болезни трансплантата при сквозной кератопластике // Труды Всероссийской конференции «Ерошевские чтения». Самара, 2012. С. 272–273.
4. Fasolo A., Capuzzo C., Fornea M. et al. Risk factors for graft failure after penetrating keratoplasty: 5-year follow-up from the corneal transplant epidemiological study. *Cornea*. 2011. Vol. 30 (12). P. 1328–1335.
5. Hofr Richard H., Plugfelder Stephen C. Clinical Evidence for Hepatitis B Transmission Resulting from Corneal Transplantation // *Cornea*. 1997. Vol. 16 (2). P. 132–137.
6. Keith A. Laycock, Ladia R. Essary, Stephen Delaney et al. A Critical Evaluation of Hepatitis C Testing of Cadaveric Corneal Donors // *Cornea*. 1997. Vol. 16 (2). P. 146–150.
7. Stavidis E., Gatziofufas Z., Hasenfus A et al. Ping-pong transmission of herpes simplex virus 1 following corneal transplantation // *Ophthalmologie*. 2012. P. 25.
8. Xiaodong Zheng. Reactivation and Donor-Host Transmission of Simplex Virus After Corneal Transplantation // *Cornea*. 2002. Vol. 21 (2). P. 90–93.