

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



### Изучение противовирусной активности жидких сред для хранения роговицы в отношении вируса простого герпеса *in vitro*

Алимбарова Л.М.<sup>1</sup>, Керимов Т.З.<sup>2</sup>, Борзенко С.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва, Россия;

<sup>3</sup> ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Минздрава России, 127486, Москва, Россия

**Цель** исследования – изучить противовирусную активность 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы на модели герпесвирусной инфекции *in vitro*.

**Материал и методы.** Изучена противовирусная активность 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы (ОСХР) на модели герпесвирусной инфекции, обусловленной вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1), штамм ЕС, в культуре клеток Vero с использованием вирусологического и статистического методов исследования.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что все исследуемые образцы среды для хранения роговицы, в том числе и базовая среда Борзенко–Мороз, не оказывают цитотоксического действия на культуру клеток Vero. Установлено, что 4 из 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы обладают достоверной противовирусной активностью в отношении ВПГ-1 при использовании по терапевтической (через 1 ч после инфицирования) и по профилактической (за 2 ч до инфицирования) схемам. Противовирусная активность установлена у 2 образцов, содержащих индуктор интерферона циклоферон в концентрации 10 и 30 мг/кг (ОСХР 2, 3 соответственно); у образца, содержащего индуктор интерферона гамапрен 15 мг/кг (ОСХР 5), и у образца, содержащего комбинацию препаратов: циклоферон 10 мг/кг и ациклический аналог нуклеозида – ацикловир 10 мг/кг (ОСХР 6). Максимальный статистически достоверный ингибиторный эффект по отношению к ВПГ-1 по результатам двух схем испытаний был выявлен у ОСХР 6, содержащего комбинацию препаратов. На фоне его применения инфекционная активность тест-вируса снижалась в среднем на 3,2 lg, коэффициент ингибиции составил 54,5%.

**Заключение.** Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования образцов противовирусных сред для хранения донорских роговиц (образцы 2, 3, 5 и 6) с целью повышения эффективности кератопластики у больных офтальмогерпесом.

**Ключевые слова:** вирус простого герпеса 1-го типа; офтальмогерпес; герпесвирусная инфекция; жидкая среда для хранения роговицы; консервация роговицы; противовирусная активность.

**Для цитирования:** Алимбарова Л.М., Керимов Т.З., Борзенко С.А. Изучение противовирусной активности жидких сред для хранения роговицы в отношении вируса простого герпеса *in vitro*. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 228-236. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236>

**Для корреспонденции:** Алимбарова Людмила Михайловна, канд. мед. наук, доцент, вед. науч. сотрудник лаборатории сравнительной вирусологии с Российским центром по герпесу ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: [virology@mail.ru](mailto:virology@mail.ru)

**Участие авторов.** Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.08.2020

Принята в печать 21.08.2020

### Study of the antiviral activity of the liquid corneal storage medium in relation to the herpes simplex virus *in vitro*

Lyudmila M. Alimbarova<sup>1</sup>, Timur Z. Kerimov<sup>2</sup>, Sergei A. Borzenok<sup>3</sup>

<sup>1</sup> National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

<sup>2</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, 127473, Russia;

<sup>3</sup> S. Fyodorov Eye Microsurgery Complex Federal State Institution, Moscow, 127486, Russia

**The aim** of the study was to assess the antiviral activity of the 7 types of liquid corneal storage medium on an experimental model of herpesvirus infection *in vitro*.

**Material and methods.** The study of antiviral activity of 7 samples of liquid corneal storage medium on a model of herpesvirus infection caused by the herpes simplex virus type 1 in Vero-cell using virological and statistical research methods was carried out.

**Results and discussion.** All the studied images of the corneal storage medium, including the Borzenka-Moroz base medium, did not have a cytotoxic effect on Vero cell culture. Out of 7 samples of liquid corneal storage medium, 4 samples had reliable antiviral activity against HSV-1 when used under the therapeutic regimen (1 hour after infection) and under the preventive regimen (2 hours before infection). Antiviral activity was established in 2 samples containing the interferon inducer cycloferon at a concentration of 10 mg/kg and 30 mg/kg (sample 2, 3), in a sample containing the interferon inducer gamapren 15 mg/kg (sample 5), and in a sample containing a combination of drugs – 10 mg/kg cycloferon and an acyclic nucleoside analog-acyclovir 10 mg/kg (sample 6). According to the results of 2 test regimens, the maximum statistically significant inhibitory effect in relation to HSV-1 was detected in sample 6, containing a combination of drugs. Against the background of sample 6, the infectious activity of the test virus decreased by an average of 3.2 lg, the inhibition coefficient was 54.5%.

**Conclusion.** The results of the study indicate the prospects of using types of media with antiviral activity (samples 2, 3, 5, 6) for storing donor corneas in order to increase the effectiveness of keratoplasty in patients with ophthalmic herpes.

**Keywords:** herpes simplex virus type 1; HSV-1; herpesvirus infection; liquid corneal storage medium; cornea preservation; antiviral activity.

**For citation:** Alimbarova L.M., Kerimov T.Z., Borzenok S.A. Study of the antiviral activity of the liquid corneal storage medium in relation to the herpes simplex virus *in vitro*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 228-236. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236>

**For correspondence:** Lyudmila M. Alimbarova, PhD (Med.), associate professor, Leading researcher of the Laboratory of comparative virology with the Russian centre for herpes National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia.  
E-mail: [virology@mail.ru](mailto:virology@mail.ru)

**Information about the authors:**

Alimbarova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-8972-3111>

Kerimov T.Z., <https://orcid.org/0000-0001-8967-6370>

Borzenok S.A., <http://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

**Contribution.** The authors contributed equally to this article.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 14 August 2020  
Accepted 21 August 2020

## Введение

Лечение офтальмогерпеса (ОФТГ) является одним из наиболее сложных и актуальных аспектов офтальмологии, несмотря на существенный прогресс медикаментозных технологий. Терапия больных ОФТГ предусматривает применение консервативной фармакотерапии, кератопластики или комбинации этих методов [1].

Консервативная фармакотерапия с использованием этиотропных противовирусных препаратов прямого действия, иммунотропных, метаболических лекарственных средств, как в режиме монотерапии, так и при комбинированном назначении, требует длительного времени и не всегда гарантирует восстановление исходных свойств роговицы и зрительных функций у больных ОФТГ [1]. Причиной неудачного лечения могут быть трудности доставки лекарственных агентов к внутриклеточно расположенному вирусу простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) – основному возбудителю ОФТГ; устойчивость вируса к противовирусным препаратам; иммунодефицит, а также осложнённое течение заболевания, приводящее к истончению, перфорации, эрозии, язве роговицы, её помутнению

и т.д. По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания роговицы занимают 4-е место в структуре основных причин слепоты и слабовидения в мире после глаукомы, возрастной макулярной дегенерации и катаракты; причём более половины из них связаны с ОФТГ [2].

Кератопластика – это хирургическая операция на роговице, применяемая с целью восстановления её функций и устранения приобретённых дефектов у больных ОФТГ, которым не помогла консервативная терапия [3]. Кератопластика предусматривает пересадку трупной донорской роговицы [4]. В зависимости от размеров и толщины пересаженного гистологического комплекса роговицы выделяют сквозную и послойную кератопластику [5]. Вероятность прозрачного приживления пересаженной роговицы очень высока и зависит от типа кератопластической операции. Несмотря на то что прозрачное приживление роговицы в течение первых 5 лет после сквозной кератопластики наблюдается у 82–93% реципиентов, при данном виде терапии наблюдаются неудачи [6]. Среди причин неудачной пересадки роговицы необходимо отметить проблемы гистосовместимости

доноров роговицы и реципиентов; функциональную неполноценность роговиц, полученных в результате трупного тканевого донорства; биологические особенности ВПГ у доноров и реципиентов; нарушения в различных звеньях иммунитета у реципиента, а также степень вовлечённости других структур глаза в патологический процесс и т.д. Установлено, что в возникновении ранних неблагоприятных исходов пересадки роговицы участвуют аутоиммунные и инфекционные факторы, а отдалённых – инфекционные. Исход кератопластики зависит также от характеристики донорского материала [7]. Первичная несостоятельность кератотрансплантата чаще наблюдается при заборе донорского материала более чем через 12 ч после смерти донора, при его хранении более 7 сут, при пересадке роговицы от донора старше 70 лет, а также при инфицировании донора и/или реципиента ВПГ-1 [8]. Рецидивы ОФТГ отмечаются у 15–47% больных после трансплантации и в 50–60% случаев приводят к отторжению трансплантата [8].

Из большого числа методов консервации роговицы с гарантией сохранения её витальных свойств в широкой практике нашли применение только три: гипотермическая консервация, нормотермическое культивирование и криоконсервация [9]. В настоящее время гипотермическая консервация является наиболее распространённой методикой хранения роговицы в глазных тканевых банках мира [10]. Сохранение целостности и витальности тканевых структур трупных донорских роговиц, повышение их жизнеспособности на этапе консервации и подготовки к трансплантации, увеличение допустимых сроков применения донорских тканей, повышение эффективности пересадок роговицы и снижение инфекционных рисков трансплантации, заключающихся в предупреждении передачи ВПГ-1 через трансплантат роговицы, требуют совершенствования методов консервации [9, 11].

По данным отечественной литературы, 21,7% донорских роговиц инфицированы вирусами группы герпеса [12]. Зарубежные авторы сообщают, что ВПГ-1 инфицировано 5,7% донорских роговиц [13].

До сих пор отсутствуют технологии консервации, позволяющие проводить эффективную вирусную деконтаминацию на предоперационном этапе в условиях глазного тканевого банка.

**Цель** настоящей работы – изучение активности 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы на модели герпесвирусной инфекции *in vitro*.

### Материал и методы

**Культура клеток.** Исследование проводили на пересаживаемой культуре клеток почек африканских зелёных марьшшек (Vero), полученной из коллекции культур тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва). В качестве ростовой среды и среды поддержки использовали среду DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 10 и 2% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко», Россия) соответственно, а также 2 мМ L-глутамин (Sigma, США) и антибиотики

(100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 40 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия)). Клеточную культуру в концентрации  $\sim 1,0 \cdot 10^5$  кл/мл рассеивали в 96-луночные пластиковые культуральные планшеты (Costar, Великобритания) и культивировали в термостате при температуре  $+37 \pm 0,5$  °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. В работе использовали однодневный клеточный монослой.

**Вирус.** В исследовании использовали тест-вирус ВПГ-1, штамм ЕС, полученный из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва). Вирус пассировали и титровали на монослойной культуре клеток Vero. Инфекционные титры ВПГ-1 определяли стандартным методом титрования и рассчитывали по методу Рида и Менча [14], выражая в логарифмических единицах (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл). Лизат культуральной вируссодержащей жидкости разливали по аликвотам и сохраняли до проведения опытов при  $-70 \pm 10,0$  °С.

**Препараты.** Исследовали 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы (далее – ОСХР) производства ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» ООО «НЭП МГ» (Москва). Базовым компонентом всех исследуемых ОСХР является среда Борзенка–Мороз. С 1990 г. её применяют для гипотермической консервации жизнеспособных трупных роговиц глаза человека (с целью обеспечения стабилизации клеточных мембран, сохранности макроэргических соединений и стабильности плотности эндотелиальных клеток в процессе холодного хранения) в глазных банках и лабораториях консервации роговиц РФ [7]. Основными компонентами среды Борзенка–Мороз являются среды М-199, F12 и DMEM в соотношении 1 : 1 : 2, хондроитин сульфат – 2,7 мас.%, декстран – 40–2,0 мас.%, антибиотик гентамицин сульфат – 0,00014 мас.%, противогрибковый антибиотик амфотерицин В – 0,00015 мас.%. Наряду с базовым компонентом в состав исследуемых ОСХР были включены различные фармакологические препараты, характеристика которых представлена в **табл. 1**.

ОСХР разливали по аликвотам и сохраняли до проведения опытов при  $+4$  °С.

**Дизайн исследования.** Противовирусную активность исследуемых ОСХР оценивали по стандартной методике в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ [15].

Исследование включало две схемы: изучение цитотоксического действия ОСХР в интактной культуре клеток Vero, а также изучение их противовирусной активности [16, 17].

Цитотоксическое действие ОСХР оценивали на культуре неинфицированных клеток Vero по влиянию на их морфологию и жизнеспособность. Для этого в суточные культуры клеток Vero, предварительно освобождённые от ростовой среды и трижды отмытые тёплым раствором Хенкса, вносили исследуемые ОСХР. В качестве контроля состояния клеточной культуры использовали питательную среду DMEM (отрицательный контроль). Культуру клеток в присутствии ОСХР и без них инкубировали при  $+37 \pm 0,5$  °С

в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. Результаты учитывали визуально методом световой микроскопии с помощью инвертированного микроскопа ежедневно в течение 96 ч по появлению цитодеструктивных изменений и изменению морфологии клеточного монослоя.

Также ежедневно определяли количество жизнеспособных клеток 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  $+37 \pm 0,5$  °C. 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.

Для дальнейшего исследования использовали ОСХР, которые либо не вызывали видимых цитодеструктивных изменений клеточного монослоя или гибели клеток по сравнению с контролем, либо вызывали видимые при микроскопии изменения морфологии или гибель менее чем 50% клеток Vero в популяции [15].

Система оценки противовирусного действия включала изучение подавления ОСХР цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток, а также их влияния на репродукцию вируса в культурах клеток. Противовирусную активность ОСХР изучали по терапевтической (через 1 ч после инфицирования) и по профилактической (за 2 ч до инфицирования) схемам.

При исследовании образцов среды по терапевтической схеме культуру клеток культивировали в 96-луночных панелях, как было описано ранее, затем среду роста удаляли, клетки трижды отмывали тёплым раствором Хенкса и заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Далее культуры клеток инкубировали

в течение 1 ч в термостате при  $+37,0 \pm 0,5$  °C, после чего вирус удаляли, культуры клеток трижды отмывали раствором Хенкса от неадсорбированного вируса и добавляли исследуемые ОСХР.

При исследовании образцов среды по профилактической схеме культуру клеток культивировали в 96-луночных панелях, как было описано ранее, затем среду роста удаляли, клетки трижды отмывали тёплым раствором Хенкса и инкубировали в течение 2 ч до инфицирования в различных образцах среды для хранения роговицы. Затем среду удаляли, клетки трижды отмывали тёплым раствором Хенкса и заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Далее культуры клеток инкубировали в течение 1 ч в термостате при  $+37,0 \pm 0,5$  °C, после чего вирус удаляли, культуры клеток трижды отмывали раствором Хенкса от неадсорбированного вируса и добавляли среду поддержки DMEM.

Эксперименты сопровождали соответствующим контролем. В качестве позитивного контроля использовали инфицированные культуры клеток, к которым добавляли поддерживающую среду DMEM; в качестве негативного контроля – неинфицированные культуры клеток, к которым добавляли поддерживающую среду DMEM; в качестве контроля цитотоксичности – неинфицированные культуры клеток, инкубируемые в присутствии исследуемых ОСХР.

Клетки (независимо от схемы испытания) инкубировали в термостате при  $+37 \pm 0,5$  °C в течение 4 сут, ежедневно визуально оценивая целостность монослоя и характер вирусспецифического ЦПД в опытных и контрольных культурах клеток методом световой микроскопии по общепринятому способу [15]. Результаты учитывали при появлении выраженного (100%) ЦПД в контрольных пробах.

Оценка противовирусного действия предусматривала также изучение инфекционной активности вируса, образовавшегося в присутствии ОСХР. Для этого

**Таблица 1.** Состав исследуемых образцов жидкой среды для хранения роговицы\*

**Table 1.** Compositions of experimental cornea storage liquid media\*

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения роговицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Срок годности, серийный номер Shelf life, serial number
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	14.08.2019–14.08.2021 № 1232019
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	23.07.2019–23.07.2021 № 1192019
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	18.07.2019–18.07.2021 № 1162019
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	14.08.2019–14.08.2021 № 1222019
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 15	25.07.2019–25.07.2021 № 1202019
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	14.08.2019–14.08.2021 № 1222019
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	14.08.2019–14.08.2021 № 1222019

**Примечание.** \* Среда Борзенка–Мороз для хранения роговицы приготовлена в соответствии с ТУ «9328-013-29039396-2008» ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» ООО «НЭП МГ».

**Note.** \* Borzenka–Moroz cornea storage medium produced according to TU «9328-013-29039396-2008» Federal State Institution «S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex» LLC «SEP» EMC».

на 4-е сутки после совместного инкубирования инфицированных культур клеток с ОСХР отбирали соответствующие пробы вирусосодержащей жидкости из опытных и контрольных лунок и титровали их на перевиваемых культурах клеток Vero по стандартной методике.

Вирусингибирующий эффект ОСХР оценивали по общепринятым показателям [15]: по снижению уровня накопления вируса под воздействием препарата и коэффициенту ингибирования.

Снижение уровня накопления вируса под влиянием ОСХР ( $\Delta$ , 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 ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл);  $A_o$  – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл).

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

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

где  $A_{\text{контр}}$  – уровень накопления вируса при культивировании в питательной среде, не содержащей ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл);  $A_{\text{оп}}$  – уровень накопления вируса

при культивировании в среде, содержащей ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл).

*Статистическая обработка данных.* Для получения статистически достоверных результатов эксперименты проводили трижды. Статистический анализ результатов выполняли общепринятыми для биологических исследований методами с применением прикладных программ анализа данных Microsoft Excel 5.0 и Statistica 7. Достоверность различий определяли по величине  $p$ . Различия признавали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Результаты изучения цитотоксического действия 7 растворов для хранения роговицы на перевиваемой линии неинфицированных клеток Vero представлены в **табл. 2**.

По данным световой микроскопии и теста с трипановым синим было установлено, что базовая среда для хранения роговицы Борзенка–Мороз (ОСХР 7) и её варианты (ОСХР 1–6), содержащие различные фармакологические препараты, не оказывали выраженного цитотоксического действия на перевиваемую линию неинфицированных клеток VERO. Жизнеспособность клеток Vero при выращивании на средах, содержащих циклоферон в концентрации 5, 10 или 30 мг/кг (ОСХР 1, 2 и 3), составила 99,4–99,3%; на среде, содержащей циклоферон 10 мг/кг и ацикловир 10 мг/кг

**Таблица 2.** Цитотоксическое действие растворов для хранения роговицы № 1–7 на перевиваемую линию неинфицированных клеток Vero  
**Table 2.** Cytotoxic effect of cornea storage media #1-7 on the continuous line of uninfected Vero cells

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения роговицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Данные метода световой микроскопии Light microscopy data		Данные метода исключения витального красителя Trypan blue exclusion test of cell viability		
		цитотоксическое действие на клетки, % cytotoxic effect on cells, %	цитотоксическое действие на клетки cytotoxic effect on cells	количество живых клеток <sup>1</sup> number of viable cells <sup>1</sup>		
				%	млн, $M \pm m^2$ mln, $M \pm m^2$	%
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	0,0	0,6	2,04±0,36	99,4 <sup>4</sup>	
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	0,0	0,6	2,03±0,32	99,4 <sup>4</sup>	
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	0,0	0,7	2,03±0,30	99,3 <sup>4</sup>	
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	0,0	1,4	2,0±0,2	98,6 <sup>4</sup>	
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka – Moroz medium + Gamapren, 15	5,0 <sup>4</sup>	7,9	1,9±0,25	92,1 <sup>4</sup>	
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	0,0	0,54	2,05±0,30	99,46 <sup>4</sup>	
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	0,0	0,1	2,04±0,25	99,9 <sup>4</sup>	
Контроль Control	Среда DMEM <sup>3</sup> DMEM medium <sup>3</sup>	0,0	0,0	2,05±0,2	100,0	

**Примечание.** <sup>1</sup> Определено методом исключения витального красителя трипанового синего; <sup>2</sup> средние значения по результатам трёх независимых опытов; <sup>3</sup> интактные клетки Vero служили в качестве контроля; <sup>4</sup> достоверность по отношению к контролю – клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM,  $p > 0,05$ .

**Note.** <sup>1</sup> According to trypan blue exclusion test of cell viability; <sup>2</sup> mean values from three independent experiments; <sup>3</sup> intact Vero cells served as control; <sup>4</sup> reliability in relation to control (Vero cells incubated in DMEM medium),  $p > 0.05$ .

(ОСХР 6), – 99,46%; на средах, содержащих гамапрен 2 и 15 мг/кг (ОСХР 4, 5), – 98,6–92,1%; и статистически достоверно не отличалась от жизнеспособности клеток, инкубируемых в питательной среде DMEM или в базовой среде Борзенка–Мороз.

В следующей серии экспериментов мы оценивали противовирусную активность ОСХР в отношении герпесвирусной инфекции, обусловленной ВПГ-1, в культуре клеток Vero. Противовирусную активность ОСХР исследовали по лечебной (через 1 ч после инфицирования) и по профилактической (за 2 ч до инфицирования) схемам. Результаты изучения противовирусной активности ОСХР представлены в табл. 3 и 4.

Как видно из данных табл. 3, ОСХР 7 не обладала противовирусной активностью в отношении тест-вируса при использовании по терапевтической схеме. Титры вируса на фоне её применения составили  $5,2 \pm 0,2$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл и статистически достоверно не отличались от таковых при использовании контрольной питательной среды DMEM ( $5,5 \pm 0,15$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл). Базовая среда Борзенка–Мороз также, как и контрольная среда DMEM, не влияла на время появления специфического ЦПД тест-вируса.

Представляло интерес исследование возможности повышения противовирусной активности базовой среды для хранения роговицы путём введения в её состав различных фармакологических препаратов, таких как циклоферон, гамапрен, а также циклоферон в сочетании с ацикловиром.

Исследование показало, что введение в состав базовой среды различных фармакологических препаратов по-разному влияет на её противовирусную активность.

Установлено, что показатель противовирусной активности варьирует не только среди ОСХР, содержащих разные фармакологические препараты, но и в пределах одного вида образцов, содержащих разные концентрации одного активного компонента. Так, добавление в базовую среду циклоферона 5 мг/кг (ОСХР 1), приводило к незначимому снижению инфекционной активности тест-вируса на 0,9 lg по сравнению с контролем вируса ( $p > 0,05$ ). Увеличение концентрации циклоферона до 10 мг/кг (ОСХР 2) способствовало статистически достоверному снижению инфекционной активности вируса на 1,98 lg. Дальнейшее увеличение концентрации циклоферона до 30 мг/кг, хотя и приводило к достоверному подавлению активности вируса на 1,5 lg по сравнению с контролем, но менее выраженному, чем при использовании циклоферона в концентрации 10 мг/кг. По степени убывания противовирусной активности ОСХР, содержащие разные концентрации циклоферона, можно расположить следующим образом: ОСХР 2 (КИ = 36%) > ОСХР 3 (КИ = 27,3%) > ОСХР 1 (КИ = 16,4%).

Введение в состав среды комбинации препаратов с разным механизмом действия (циклоферон 10 мг/кг и ацикловир 10 мг/кг) приводило к статистически значимому увеличению её противовирусной активности (КИ = 56,4%). На фоне применения ОСХР 6 инфекционная активность вируса была достоверно ниже, чем при использовании среды, содержащей 10 мг/кг циклоферона или базовой среды. Титры вируса при использовании вышеперечисленных сред составили  $2,4 \pm 0,25$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл;  $3,52 \pm 0,15$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл;  $5,2 \pm 0,2$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл соответственно.

**Таблица 3.** Влияние среды для хранения роговицы, содержащей различные фармакологические препараты, на течение герпесвирусной инфекции, обусловленной вирусом простого герпеса 1-го типа, штамм ЕС, в культуре клеток Vero при использовании по лечебной схеме

**Table 3.** Influence of cornea storage media with various pharmacological preparations on the course of herpesvirus infection caused by HSV-1, «ES» strain, in Vero cell culture when used according to the treatment regimen

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения роговицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Уровень накопления вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /0,1 мл, $M \pm m^1$ Virus accumulation rate, lg TCID <sub>50</sub> /0,1 ml, $M \pm m^1$	Подавление репродукции вируса, Δ, lg Suppression of virus reproduction, Δ, lg	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	4,6±0,1	0,9	16,4
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	3,52±0,15 <sup>2</sup>	1,98 <sup>2</sup>	36,0 <sup>2</sup>
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	4,0±0,25 <sup>2</sup>	1,5 <sup>2</sup>	27,3 <sup>2</sup>
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	4,6±0,2	0,9	16,4
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 15	3,62±0,15 <sup>2</sup>	1,88 <sup>2</sup>	34,2 <sup>2</sup>
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	2,4±0,25 <sup>2</sup>	3,1 <sup>2</sup>	56,4 <sup>2</sup>
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	5,2±0,2	0,3	5,45
Вирус Virus	Среда DMEM (контроль) DMEM medium (control)	5,5±0,15	–	–

**Примечание.** <sup>1</sup> Средние значения по результатам трёх независимых опытов; <sup>2</sup> достоверность по отношению к контролю – инфицированные клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM,  $p < 0,05$ .

**Note.** <sup>1</sup> Mean values from three independent experiments; <sup>2</sup> reliability in relation to control (infected Vero cells incubated in DMEM medium),  $p < 0.05$ .

Добавление в состав базовой среды индуктора интерферона гамапрена в концентрации 2 мг/кг (ОСХР 4) приводило к статистически недостоверному снижению инфекционной активности вируса на 0,9 lg по сравнению с контролем вируса, в то время как увеличение концентрации до 15 мг/кг (ОСХР 5) – к статистически достоверному снижению активности вируса на 1,88 lg. КИ составил 34,2% и достоверно превышал КИ базовой среды Борзенка–Мороз (5,45%), однако был сопоставим с таковым у ОСХР 2, содержащего 10 мг/кг циклоферона (36%).

Согласно данным литературы, критерием оценки активности препарата *in vitro* является снижение титра вируса не менее чем на 1,5–2,0 lg, подавление уровня накопления вируса в условиях одноциклового исследования под влиянием препарата на 1,25–2,0 lg и больше [15]. Представленные выше результаты свидетельствуют о наличии у 4 из 7 образцов для хранения рогаковицы (ОСРХ 2, 3, 5, 6) достоверной противовирусной активности в отношении ВПГ-1.

Введение фармакологических препаратов в состав ОСХР 2, 3, 5, и 6 способствовало также замедлению появления специфического ЦПД вируса в среднем на 48 ч по сравнению с таковым у контрольного вируса.

В следующей серии экспериментов мы исследовали противовирусную активность модифицированных растворов для хранения рогаковицы по профилактической схеме – за 2 ч до инфицирования (см. табл. 4).

Как видно из данных табл. 4, при профилактической схеме применения базовая среда для хранения

рогаковицы, как и в предыдущей серии опытов, достоверной противовирусной активностью в отношении тест-вируса не обладала. Титры вируса на фоне её применения составили  $5,5 \pm 0,3$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл и статистически достоверно не отличались от таковых при использовании контрольной питательной среды DMEM ( $6,0 \pm 0,25$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл). Изменение схемы применения базовой среды не повлияло и на время появления специфического ЦПД тест-вируса.

Иная картина наблюдалась при исследовании модифицированных ОСХР. В профилактической схеме применения противовирусная активность образцов, содержащих циклоферон в концентрации 5 мг/кг (ОСХР 1), 10 мг/кг (ОСХР 2) или 30 мг/кг (ОСХР 3), была выше, чем при использовании по лечебной схеме. Однако данное изменение не было статистически достоверным. По степени убывания активности образцы, содержащие разные концентрации циклоферона, можно расположить следующим образом: ОСХР 2 (КИ = 41,3%) > ОСХР 3 (КИ = 33,3%) > ОСХР 1 (КИ = 21,7%).

Инкубация клеток в течение 2 ч до инфицирования в среде, содержащей циклоферон 10 мг/кг и ацикловир 10 мг/кг, приводила к статистически достоверному снижению инфекционной активности тест-вируса на 3,4 lg по сравнению с контролем. КИ ОСХР 6 составил 51,7% и статистически достоверно не отличался от аналогичного показателя, полученного при использовании образца по лечебной схеме.

**Таблица 4.** Влияние среды для хранения рогаковицы, содержащей различные фармакологические препараты, на течение герпесвирусной инфекции, обусловленной вирусом простого герпеса 1-го типа, штамм ЕС, в культуре клеток Vero<sup>1</sup> при использовании по профилактической схеме

**Table 4.** Influence of cornea storage media with various pharmacological preparations on the course of herpesvirus infection caused by HSV-1, «ES» strain, in Vero<sup>1</sup> cell culture when used according to the prophylactic regimen

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения рогаковицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Уровень накопления вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /0,1 мл, $M \pm m^1$ Virus accumulation rate, lg TCID <sub>50</sub> /0,1 ml, $M \pm m^1$	Подавление репродукции вируса, lg Suppression of virus reproduction, Δ, lg	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	4,7±0,1	1,3	21,7
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	3,52±0,25	2,48 <sup>2</sup>	41,3 <sup>2</sup>
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	4,0±0,25	2,0 <sup>2</sup>	33,3 <sup>2</sup>
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	5,0±0,2	1,0	16,7
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 15	4,3±0,25 <sup>2</sup>	1,7 <sup>2</sup>	28,3 <sup>2</sup>
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	2,61±0,25 <sup>2</sup>	3,4 <sup>2</sup>	51,7 <sup>2</sup>
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	5,5±0,3	0,5	8,33
Вирус Virus	Среда DMEM DMEM medium	6,0±0,25	-	-

**Примечание.** <sup>1</sup> Средние значения по результатам трёх независимых опытов; <sup>2</sup> достоверность по отношению к контролю – инфицированные клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM,  $p < 0,05$ .

**Note.** <sup>1</sup> mean values from three independent experiments; <sup>2</sup> reliability in relation to control (infected Vero cells incubated in DMEM medium),  $p < 0,05$ .

Инкубация клеток в среде, содержащей гамапрен 2 или 15 мг/кг, приводила к подавлению инфекционной активности тест-вируса на 1,0 и 1,7 lg соответственно. КИ ОСХР 4 составил 16,7%, ОСХР 5 – 28,3%.

Представленные выше результаты свидетельствуют о том, 4 из 7 исследуемых образцов среды для хранения роговицы обладают достоверной противовирусной активностью в отношении тест-вируса, независимо от схемы их использования.

### Обсуждение

ВПГ-1 может вызывать различные патологические изменения в роговице. Так, в клинической офтальмологии герпетические кератиты – одна из самых распространённых патологий роговицы [18]. При этом именно пересадка роговичной ткани в ходе сквозных и послойных кератопластических операций считается наиболее популярным типом трансплантации [18]. Подсчитано, что с августа 2012 г. по август 2013 г. в мире было проведено 184 576 кератопластических операций с использованием 283 530 роговиц, полученных из 742 глазных тканевых банков [18].

Выживаемость трансплантатов может составлять 82–93% в отсутствие неблагоприятных последствий пересадки [19]. Однако, как и любое хирургическое вмешательство, сквозная кератопластика сопряжена с некоторыми рисками. Значительную часть из них составляют инфекционные осложнения, в том числе развитие герпетического кератита в трансплантате роговицы в послеоперационном периоде. Крайне важно, что данное состояние возникает на фоне обязательных инстилляций иммуносупрессивных препаратов. Подобные ситуации представляют угрозу для состоятельности трансплантата роговицы. К сожалению, в настоящее время в глазных тканевых банках мира отсутствуют методы профилактики развития подобных состояний. Проведённое нами экспериментальное исследование демонстрирует, что базовая консервационная среда, а также питательная среда для культивирования не оказывают противовирусного эффекта на ВПГ-1 и, следовательно, не препятствуют его распространению в роговичной ткани. В литературе описаны случаи развития герпетического кератита в трансплантате роговицы, хранящемся в среде Optisol GS в условиях гипотермической консервации [20].

Одной из главных задач в процессе разработки многокомпонентных сред для вирусной деконтаминации трансплантата роговицы на консервационном этапе является оценка противовирусной эффективности предлагаемых растворов. В данном экспериментальном исследовании в качестве базового консервационного раствора нами использована отечественная среда для консервации трупных донорских роговиц (Борзенка–Мороз), к которой были добавлены препараты, обладающие противогерпетической активностью, в авторских концентрациях, не оказывающих цитотоксического действия. Применение индукторов интерферонов (таких как циклоферон, гамапрен) в различных количествах позволило обозначить диапазоны концентраций, в которых использованные

препараты обладают наибольшей противовирусной активностью при незначительном цитотоксическом эффекте. Согласно данным литературы, использование препаратов фармакологической группы интерферонов и индукторов интерферонов совместно с аномальными нуклеозидами (например, с ацикловиром) может оказывать синергетическое противовирусное действие [21]. В проведённом экспериментальном исследовании сочетание препаратов данных фармакологических групп показало наиболее выраженный противовирусный эффект. При использовании среды, содержащей комбинацию препаратов, по терапевтической и профилактической схемам применения КИ составил 56,4 и 51,7% соответственно.

По нашему мнению, вирусная деконтаминация донорских роговиц на консервационном этапе в условиях глазного тканевого банка может стать основным способом профилактики передачи ВПГ-1 от донора к реципиенту в ходе сквозной кератопластики, а также способна снизить вероятность реактивации латентной герпетической инфекции в трансплантате роговицы в раннем послеоперационном периоде и развития связанных с ней осложнений.

### Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования образцов противовирусных сред для хранения донорских роговиц (2, 3, 5, 6) с целью повышения эффективности кератопластики у больных офтальмогерпесом.

### ЛИТЕРАТУРА

- Исаков В.А., ред. *Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей*. СПб.: СпецЛит; 2013.
- Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D., Kocur I., Pararajasegaram R., Pokharel G.P., et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 2004; 82(11): 844-51.
- Каспаров А.А. *Офтальмогерпес*. М.: Медицина; 1994.
- Amiri F., Ghiyasvandian S., Navab E., Zakerimoghadam M. Corneal transplantation: A new view of life. *Electron. Physician.* 2017; 9(4): 4055-63.  
DOI: <http://doi.org/10.19082/4055>
- Spadea L., De Rosa V. Current techniques of lamellar keratoplasty for keratoconus. *Saudi Med. J.* 2016; 37(2): 127-36.  
DOI: <http://doi.org/10.15537/smj.2016.2.12985>
- Rahman I., Carley F., Hillarby C., Brahma A., Tullo A.B. Penetrating keratoplasty: indications, outcomes, and complications. *Eye (Lond.)*. 2009; 23(6): 1288-94.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.2008.305>
- Борзенко С.А. *Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы*: Дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2008.
- Кагушева А.Э. *Прогнозирование, профилактика и лечение персистирующих эрозий и язв трансплантата роговицы при сквозной кератопластике высокого риска*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2013.
- Борзенко С.А., Ролик О.И., Онищенко Н.А., Комах Ю.А. Методы консервации донорских роговиц и применение гомологичных клеточных пептидов. *Офтальмология*. 2011; (4): 75-8.
- Armitage W.J. Preservation of human cornea. *Transfus. Med. Hemother.* 2011; 38(2): 143-7.  
DOI: <http://doi.org/10.1159/000326632>
- Керимов Т.З., Борзенко С.А., Гаврилова Н.А., Тонаева Х.Д. Герпесвирусная инфекция трансплантата роговицы: подходы к вирусной деконтаминации на этапе консервации. *Практическая медицина*. 2018; 16(3): 89-92.

12. Миронкова Е.А., Макаров П.В., Слепова О.С., Гундорова Р.А., Кутушева А.З., Демкин В.В. и др. Инфицированность донорского материала вирусами группы герпеса как возможная причина развития болезни трансплантата при сквозной кератопластике. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012; 14(4): 48-51. DOI: <http://doi.org/10.15825/1995-1191-2012-4-48-51>
13. Shimomura Y., Deai T., Fukuda M., Higaki S., Hooper L.C., Hayashi K. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea*. 2007; 26(2): 190-3. DOI: <http://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31802eae6>
14. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene*. 1938; 27: 493-7.
15. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлёва М.В., Лепакхин В.К. и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I*. М.: Гриф и К; 2012.
16. Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro*. 2003; 17(1): 41-7. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](http://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
17. Cotarelo M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Menasalvas A., Cercenado E., Tenorio A., et al. Cytopathic effect inhibition assay for determining the in vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 44(5): 705-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
18. Gain P., Jullienne R., He Z., Aldossary M., Acquart S., Cognasse F., et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134(2): 167-73. DOI: <http://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4776>
19. Williams K.A., Muehlberg S.M., Lewis R.F., Coster D.J. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian Corneal Graft Register. *Eye (Lond)*. 1995; 9(Pt. 2): 219-27. DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.1995.43>
20. Kaye R., Steger B., Chen J.Y., Romano V. A serious adverse surgical event: Management of suspected HSV-1 keratitis in a donor cornea. *Spektrum Augenheilkd.* 2017; 31(1): 19-22. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00717-016-0325-6>
21. Wilhelmus K.R. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; 1: CD002898. DOI: <http://doi.org/10.1002/14651858.CD002898.pub5>
6. Rahman I., Carley F., Hillarby C., Brahma A., Tullo A.B. Penetrating keratoplasty: indications, outcomes, and complications. *Eye (Lond)*. 2009; 23(6): 1288-94. DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.2008.305>
7. Borzenok S.A. *Medico-technological and methodological bases of effective activity of ocular tissue banks of Russia in providing operations for end-to-end corneal transplantation*: Diss. Moscow; 2008. (in Russian)
8. Kagusheva A.E. *Prediction, prevention and treatment of persistent erosions and corneal graft ulcers in high-risk end-to-end keratoplasty*: Diss. Moscow; 2013. (in Russian)
9. Borzenok S.A., Rolik O.I., Onishchenko N.A., Komakh Yu.A. Methods of conservation of donor corneas and application of homologous cell peptides. *Ofital'mologiya*. 2011; (4): 75-8. (in Russian)
10. Armitage W.J. Preservation of human cornea. *Transfus. Med. Hemother.* 2011; 38(2): 143-7. DOI: <http://doi.org/10.1159/000326632>
11. Kerimov T.Z., Borzenok S.A., GavriloVA N.A., Tonaeva Kh.D. Herpesvirus infection in cornea graft: current approaches to therapy and viral decontamination during storage. *Prakticheskaya meditsina*. 2018; 16(3): 89-92. (in Russian)
12. Mironkova E.A., Makarov P.V., Slepova O.S., Gundorova P.A., Kugusheva A.Z., Demkin V.V., et al. Herpes virus contamination of donor's tissue as a potential etiology of corneal graft disease after penetrating keratoplasty. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2012; 14(4): 48-51. DOI: <http://doi.org/10.15825/1995-1191-2012-4-48-51> (in Russian)
13. Shimomura Y., Deai T., Fukuda M., Higaki S., Hooper L.C., Hayashi K. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea*. 2007; 26(2): 190-3. DOI: <http://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31802eae6>
14. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene*. 1938; 27: 493-7.
15. Mironov A.N., Bunatyan N.D., Vasil'ev A.N., VerstaKova O.L., Zhuravleva M.V., Lepakhin V.K., et al. *Guidelines for Conducting Preclinical Research of Medicines. Part 1 [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
16. Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro*. 2003; 17(1): 41-7. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](http://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
17. Cotarelo M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Menasalvas A., Cercenado E., Tenorio A., et al. Cytopathic effect inhibition assay for determining the in vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 44(5): 705-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
18. Gain P., Jullienne R., He Z., Aldossary M., Acquart S., Cognasse F., et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134(2): 167-73. DOI: <http://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4776>
19. Williams K.A., Muehlberg S.M., Lewis R.F., Coster D.J. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian Corneal Graft Register. *Eye (Lond)*. 1995; 9(Pt. 2): 219-27. DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.1995.43>
20. Kaye R., Steger B., Chen J.Y., Romano V. A serious adverse surgical event: Management of suspected HSV-1 keratitis in a donor cornea. *Spektrum Augenheilkd.* 2017; 31(1): 19-22. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00717-016-0325-6>
21. Wilhelmus K.R. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; 1: CD002898. DOI: <http://doi.org/10.1002/14651858.CD002898.pub5>

## REFERENCES

1. Isakov V.A., ed. *Human Herpesvirus Infections: A Guide for Physicians [Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей]*. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
2. Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D., Kocur I., Pararajasegaram R., Pokharel G.P., et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 2004; 82(11): 844-51.
3. Kasparov A.A. *Ophthalmogерpes [Ofital'mogerpes]*. Moscow: Meditsina; 1994. (in Russian)
4. Amiri F., Ghiyasvandian S., Navab E., Zakerimoghadam M. Corneal transplantation: A new view of life. *Electron. Physician*. 2017; 9(4): 4055-63. DOI: <http://doi.org/10.19082/4055>
5. Spadea L., De Rosa V. Current techniques of lamellar keratoplasty for keratoconus. *Saudi Med. J.* 2016; 37(2): 127-36. DOI: <http://doi.org/10.15537/smj.2016.2.12985>