



Противовирусная активность комплексного германийорганического соединения ацикловира в системах *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*)

Алимбарова Л.М.¹, Амбросов И.В.², Матело С.К.², Баринский И.Ф.¹

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

²ООО «ВДС Фарма», 123592, Москва, Россия

Введение. Значительный рост заболеваемости различными формами герпесвирусной инфекции (ГВИ) диктует необходимость поиска новых подходов к модификации одного из базовых противовирусных препаратов ацикловира (АЦВ) (Aciclovir; ACV) и его лекарственных форм с целью улучшения их биофармацевтических характеристик и повышения эффективности терапии. Одним из перспективных в данном аспекте является комплексное германийорганическое соединение ацикловира (КГОСА).

Цель исследования – изучение противовирусной активности КГОСА в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) (герпесвируса человека, ГВЧ) (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) на моделях ГВИ *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы. С использованием вирусологического и статистического методов изучена активность КГОСА в лечебной схеме в отношении ВПГ 1 типа (ВПГ-1) (ГВЧ-1) (штамм «Кл»), ВПГ-2 (ГВЧ-2) (штамм «ВН») на моделях ГВИ *in vitro* на культуре клеток Vero и генитального герпеса (ГГ), вызванного ВПГ-2 (штамм «ВН»), у самцов морских свинок (*Canis porcellus*).

Результаты и обсуждение. Установлено, что КГОСА ингибирует репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2 в клетках Vero. На модели ГГ у инфицированных животных препарат также обладает анти-ВПГ-активностью, приводящей к уменьшению выраженности симптоматики, тяжести и продолжительности заболевания, интенсивности и длительности выделения вируса. Наиболее выраженная активность соединения выявлена при применении в виде геля 3% местно 5 раз в день в течение 5 сут на ранних сроках после заражения. Отсроченное использование КГОСА (через 48 ч после инфицирования) также демонстрировало статистически значимую эффективность, сравнимую с таковой коммерческих референс-препаратов, в т.ч. содержащих АЦВ или его пролекарства: ацикловир (крем 5%), АИЛ (ацикловир+интерферон альфа-2b+лидокаин, мазь 3%), пенцикловир (крем 1%). КГОСА значимо снижал выраженность симптомов ГГ, уменьшал период вирусовыделения, а также инфекционную активность возбудителя по сравнению с этими параметрами у животных группы контроля и особой, получавших плацебо. Активность препарата, по-видимому, обусловлена его улучшенными биофармацевтическими характеристиками относительно АЦВ, а также наличием ряда биологических активностей у входящих в его состав компонентов.

Заключение. Результаты исследования позволяют рассматривать КГОСА как основу для разработки терапевтических средств для ГВИ, обладающих противовирусной активностью.

Ключевые слова: вирус простого герпеса; герпесвирусная инфекция; генитальный герпес; комплексное германийорганическое соединение ацикловира; противовирусная активность; морские свинки

Для цитирования: Алимбарова Л.М., Амбросов И.В., Матело С.К., Баринский И.Ф. Противовирусная активность комплексного германийорганического соединения ацикловира в системах *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 368-382. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-76>

Для корреспонденции: Алимбарова Людмила Михайловна, канд. мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной вирусологии с Российским центром по герпесу ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: virology@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Финансирование. Исследование проведено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Для исследования субстанция предоставлена ООО «ВДС Фарма» (резидент Биомедицинского кластера Инновационного центра «Сколково»); в состав авторов входят сотрудники фирмы. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (Протокол № 2/1 от 04.02.2016).

Поступила 17.08.2021
Принята в печать 07.10.2021
Опубликована 31.10.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-76>

Antiviral activity of the organic germanium complex with aciclovir against herpes simplex virus (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) in the *in vitro* and *in vivo* systems

Ludmila M. Alimbarova¹, Igor' V. Ambrosov², Svetlana K. Matelo², Igor' F. Barinsky¹

¹FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

²«VDS Pharma» LLC, 123592, Moscow, Russia

Introduction. A significant increase in the incidence of various forms of herpesvirus infection (HVI) determines the need to search for new approaches to the modification of one of the basic antiviral drugs aciclovir (ACV) and its dosage forms to improve their biopharmaceutical characteristics and increase the effectiveness of therapy. In this aspect, an innovative organic germanium complex with aciclovir (OGCA) is promising.

The **aim** of the study was to assess the antiviral activity of OGCA against the herpes simplex virus (HSV) (human herpes virus, HHV) on the HVI models both *in vitro* and *in vivo*.

Material and methods. We studied the activity of OGCA in a therapeutic regimen against HSV-1 (HHV-1) (KI strain), HSV-2 (HHV-2) (VN strain) using virological and statistical research methods in the *in vitro* model of HVI on Vero cell culture and the model of genital herpes (GH) caused by HHV-2 (VN strain) in male guinea pigs (*Canis porcellus*).

Results and discussion. It was found OGCA inhibits the replication of HHV-1 and HHV-2 in Vero cells, and has anti-HHV activity in the GH model in male guinea pigs, leading to a decrease in the severity and duration of the disease, the intensity and duration of viral shedding. The most pronounced activity was detected when preparation was applied topically 5 times a day for 5 days at the early stages of infection (3% gel). The delayed use of OGCA (48 hours after infection) also had statistically significant efficacy compared to commercial reference drugs containing aciclovir or its pro-drugs: aciclovir (5% cream), AIL (acyclovir+interferon alfa-2b+lidocaine, 3% ointment), penciclovir (1% cream). OGCA significantly reduced the number of days of the pathogen shedding, as well as its infectivity, compared to animals in the control group and ones receiving placebo. The activity of OGCA, apparently, is due to its improved biopharmaceutical characteristics compared to aciclovir, as well as the presence of a number of biological activities of its constituent components.

Conclusion. The results of the study allow us to consider OGCA as the basis for the development of antiviral agents for the treatment of HVI.

Key words: herpes simplex virus; herpesvirus infection; genital herpes; organic germanium complex with aciclovir; antiviral activity; guinea pigs

For citation: Alimbarova L.M., Ambrosov I.V., Matelo S.K., Barinsky I.F. Antiviral activity of the organic germanium complex with aciclovir against the herpes simplex virus (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 368-382 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-76>

For correspondence: Ludmila M. Alimbarova, Ph.D. (Med.), Associate Professor, Lead Researcher of the Comparative Virology Laboratory with the Russian Centre for Herpes, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: virology@mail.ru

Information about the authors:Alimbarova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-8972-3111>Ambrosov I.V., <https://orcid.org/0000-0001-7418-8171>Matelo S.K., <https://orcid.org/0000-0002-1752-042X>Barinsky I.F., <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Contribution: the authors contributed equally to this article.

Funding. The study was funded by the State budget.

Conflict of interest. For the study, the substance was presented by «VDS Pharma» LLC (Resident of the Biomedical Cluster of the Skolkovo Innovation Center); the authors include employees of the company. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the institution (Protocol No. 2/1 dated 04.02.2016).

Received 17 August 2021

Accepted 07 October 2021

Published 31 October 2021

Введение

Вирусы простого герпеса (ВПГ) (герпесвирусы человека, ГВЧ) 1 и 2 типов широко распространены в человеческой популяции и способны вызывать разные по степени тяжести заболевания (назальный/лабиальный герпес, herpes nasalis/labialis; генитальный герпес (ГГ), herpes genitalis; офтальмогерпес; энцефалит; полиорганные поражения и др.) [1, 2]. По эпидемиологическим оценкам, в мире ВПГ-1 (ГВЧ-1) инфицировано 66,6% населения в возрасте от 0 до 49 лет, или 3,4 млрд человек, и ВПГ-2 (ГВЧ-2) – 13,2% населения в возрасте от 15 до 49 лет, или 491,5 млн человек [3,4].

Среди всех противовирусных средств, используемых в клинической практике, препаратом 1 линии при лечении различных форм герпесвирусной инфекции (ГВИ) является ацикловир (АЦВ) (Aciclovir, ACV; 9-([2-гидроксиэтокси]метил]-гуанин, C₈H₁₁N₅O₃) – синтетический аналог пуринового нуклеозида [2, 5]. Механизм действия АЦВ основан на том, что он, конкурентно взаимодействуя с ДНК-полимеразой ВПГ, включается вместо дезоксигуанозина в вирусную ДНК, блокирует её синтез и репликацию вируса [5, 6]. Однако применение АЦВ (пероральное в эпизодическом или супрессивном режимах, парентеральное либо местное) в ряде случаев не приводит к ожидаемому результату [2, 5–8]. Отсутствие эффекта может быть обусловлено рядом факторов, в т.ч. связанных с биофармацевтическими параметрами препарата и его лекарственных форм: низкая всасываемость в желудочно-кишечном тракте в результате гидрофильности и малой пероральной биодоступности (~20%); незначительная растворимость в воде (1,3 мг/мл при 25° С и 2,5 мг/мл – при 37° С); сниженная трансдермальная диффузия при использовании топических форм [2, 5, 7]. На эффективность также могут оказывать влияние индивидуальные характеристики пациента (особенности функционирования органов и систем, прежде всего иммунной [2]) и биологические особенности вируса (способность к латенции, персистенции, формирование штаммов ВПГ, устойчивых к действию АЦВ) [2, 6–8].

Повышение эффективности терапии больных с разными формами ГВИ диктует необходимость поиска новых путей модификации АЦВ и его лекарственных форм с целью улучшения их биофармацевтических характеристик [2, 5, 9]. Так, одним из подходов к решению указанной проблемы в отношении топической терапии является разработка комбинированных пре-

паратов, например содержащих АЦВ и противовоспалительные соединения [9, 10] или интерферон (IFN) [2]. Другим подходом к улучшению биодоступности АЦВ является синтез новых молекул по принципу «me-too drug». Примерами таких производных, полученных химической модификацией АЦВ, служат валацикловир и фамцикловир, которые легче проникают в клетку и превращаются в ней в целевое вещество, подавляющее размножение ВПГ [6, 11]. Валацикловир, представляя собой пролекарство, трансформирующееся в организме в валин (Val, V) и АЦВ, обладает по сравнению с ним лучшей биодоступностью (55%) и более высокой скоростью всасывания в кишечнике. Тем не менее он, так же как и АЦВ, эффективен в больших дозах (до 1000–2000 мг/сут) [2, 6, 11]. Фамцикловир (пролекарство пенцикловира (2-амино-1,9-дигидро-9-[4-гидрокси-3-(гидроксиметил)бутил]-6Н-пурин-6-он)) характеризуется более высокими показателями биодоступности (до 77%) и эффективности, однако его водная растворимость ограничена быстрым образованием преципитирующих труднорастворимых моногидратов (2–3%) [2, 6, 11].

Перспективным в данном аспекте является новое комплексное германийорганическое соединение ацикловира (КГОСА), синтезированное в соответствии с принципом «me-too drug» и состоящее из 2 атомов германия (Ge), координированных 4 остатками лимонной кислоты, молекулы АЦВ и аминокислоты аргинина (Arg, R) [12]. Введение в состав вещества германийорганического соединения обусловлено наличием у последнего противоопухолевой, иммуноадьювантной, противовирусной, анальгезирующей, антиоксидантной, противовоспалительной, регенерирующей активностей, а также способности благоприятно влиять на деятельность различных органов и систем [13]. Известно, что Ge, являясь эссенциальным микроэлементом, необходим для нормального функционирования иммунной системы человека [13, 14]. Установлено, что в составе германийорганических соединений он может оказывать воздействие на CD4+ клетки, НК-клетки, моноциты/макрофаги, В-лимфоциты, опосредованно влиять на выработку ряда цитокинов (интерлейкинов (IL) -3, -4, -13; фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor) альфа (TNF-α); IFN-γ), а также антител [13, 15].

Цель настоящей работы – изучение противовирусной активности КГОСА в отношении ВПГ на моделях ГВИ *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы

Вирусы. В исследовании использовали вирусы ВПГ-2 (штамм «ВН») и ВПГ-1 (штамм «Кл»), полученные из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Биологическую активность вирусов определяли стандартным методом титрования [16] в клеточной культуре Vero и рассчитывали по методу Рида и Менча [17], выражая в логарифмических единицах (\lg ТЦИД₅₀/0,1 мл; ТЦИД₅₀ – тканевая цитопатическая инфекционная доза).

Культура клеток. Выделение возбудителей из образцов биологического материала, пассирование и титрование проводили на перевиваемой культуре клеток почек африканских зелёных марьшшек (*Chlorocebus sabaeus*) Vero, полученной из коллекции культур тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». В качестве ростовой и поддерживающей сред использовали среду Игла (ПанЭко, Россия), содержащую 10 и 2% эмбриональной телячьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) (ПанЭко) соответственно, а также 2 мМ L-глутамина (Sigma, США) и антибиотики: 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 40 мкг/мл гентамицина (ПанЭко). Клеточную культуру в концентрации $\sim 1,0 \times 10^5$ 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% диоксида углерода (CO₂). Эксперименты проводили на суточных культурах Vero.

Препараты. КГОСА ($\text{Ge}_2[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_4[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3][\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]$) представляет собой комплексное германийорганическое соединение АЦВ (рис. 1). На долю последнего в составе молекулы вещества приходится 15% (в массовом отношении).

КГОСА (Россия) – гель 3% для наружного применения. В качестве плацебо использовали основу геля КГОСА; в качестве референс-препаратов – коммерческие противовирусные препараты в соответствии с инструкциями их производителей: ацикловир (Великобритания) – лиофилизат для приготовления инфузий и крем 5% для наружного применения, в 1 г которого содержится 50 мг ацикловира; Пенцикловир

(Германия) – крем 1% для наружного применения, 1 г которого содержит 10 мг пенцикловира; АИЛ (Россия) – мазь для наружного применения, содержащая ацикловир 3% + IFN α -2b рекомбинантный человеческий 20 000 МЕ/г + лидокаин 1%.

При изучении противовирусной активности *in vitro* 5 мг каждого из исследуемых соединений (КГОСА, АЦВ) растворяли в 1 мл дистиллированной воды (H₂O) для получения маточных растворов с концентрацией 5 мг/мл. Данные растворы фильтровали через фильтры Swinnox (Merck Millipore, Германия) с размером пор 0,22 мкм, разливали по аликвотам и сохраняли при -70 °С. Непосредственно перед проведением исследований *in vitro* из маточных растворов готовили разведения тестируемых веществ на питательной среде Игла.

Животные. Исследования выполняли на самцах морских свинок (*Canis porcellus*) массой 250–350 г. Все особи были получены из питомника лабораторных животных «Столовая» (филиал ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская область, Россия) и содержались на стандартном рационе в условиях вивария. При выполнении лабораторных экспериментов придерживались требований правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой в Страсбурге 18 марта 1986 г. и подтверждённой там же 1 июня 2006 г. (ETS N 123), ([https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/GT123\(2002\)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf](https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/GT123(2002)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf)).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (Протокол № 2/1 от 04.02.2016).

Дизайн исследования. Изучение активности препаратов *in vitro* и *in vivo* проводили в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета МЗ РФ [16].

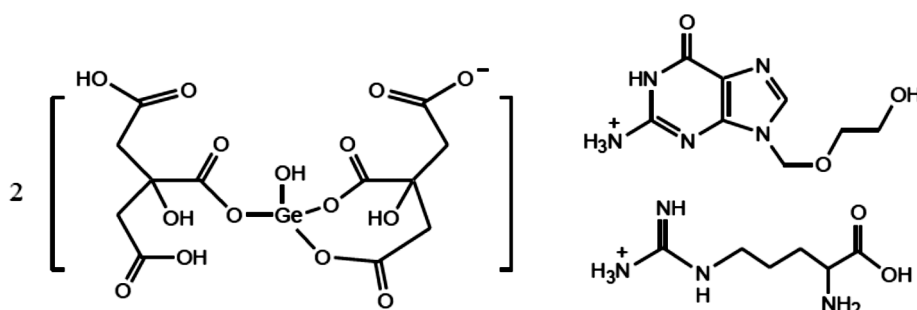


Рис. 1. Структура комплексного германийорганического соединения ацикловира.

Fig. 1. Structure of the organic germanium complex with aciclovir.

Исследование *in vitro* включало 2 схемы: определение цитотоксического действия препаратов в интактной культуре Vero, а также оценку их противовирусной активности.

Цитотоксическое действие препаратов оценивали на культуре неинфицированных клеток Vero по влиянию на их морфологию и жизнеспособность по стандартной методике [6, 18], описанной ранее [19]. Количество жизнеспособных клеток определяли методом исключения витального красителя трипанового синего (0,4% раствор). Число жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (окрашенных голубым цветом) клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток в популяции (V) рассчитывали по формуле:

$$V (\text{в } \%) = \frac{N}{N_t} \times 100 \quad (1),$$

где N – число жизнеспособных (неокрашенных) клеток; N_t – общее число клеток.

Значение CC_{50} (cytotoxicity concentration) – 50% цитотоксической концентрации препарата, снижающей жизнеспособность обработанных клеток на 50% по сравнению с необработанными, рассчитывали по стандартной методике [20].

Противовирусную активность препаратов in vitro оценивали по подавлению цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток, а также их влиянию на репликацию вируса в клеточных культурах в соответствии с методиками, разработанными М. Cotarelo и соавт. [21], J. Kruppenbacher и соавт. [22], как описано нами ранее [19].

Культуру клеток Vero культивировали согласно приведённому выше описанию, после чего среду роста удаляли, клетки отмывали раствором Хенкса и заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦИД₅₀. Далее культуры инкубировали в течение 1 ч в термостате при $+37,0 \pm 0,5$ °С, супернатант удаляли, клетки повторно отмывали раствором Хенкса, добавляли к ним исследуемые препараты в разных концентрациях в составе поддерживающей среды и инкубировали в термостате при $+37,0 \pm 0,5$ °С на протяжении 96 ч. Эксперименты сопровождали соответствующими контролями. В качестве позитивного и негативного контроля использовали соответственно инфицированные и неинфицированные клеточные культуры, к которым добавляли поддерживающую среду Игла. Контролем цитотоксичности служили неинфицированные культуры клеток, инкубируемые в присутствии тестируемых препаратов. Учёт результатов осуществляли методом световой микроскопии по общепринятому способу на 4 сут после контакта клеток с инфекционным материалом, после появления выраженного (100%) ЦПД в контрольных пробах (позитивный контроль) [19]. Для получения статистически достоверных результатов эксперименты выполняли трижды.

Эффективность препарата количественно выражали как IC_{50} (inhibitory concentration) – 50% ингибирующая концентрация препарата, снижающая на 50% развитие вирусиндуцированного ЦПД. IC_{50}

рассчитывали посредством регрессионного анализа дозозависимых кривых [20]. Селективный индекс (selective index, SI) препарата рассчитывали как отношение 50% цитотоксической концентрации (CC_{50}) к 50% ингибирующей концентрации (IC_{50}).

Экспериментальная герпесвирусная инфекция у морских свинок. ГГ у самцов морских свинок моделировали по стандартной методике, также описанной нами ранее [23]. Животных заражали вирусосодержащей жидкостью (ВПГ-2, штамм «ВН» в дозе 100 ТЦИД₅₀), которую наносили при помощи пипетки (с последующим втиранием) на предварительно скарифицированную кожу пениса. Скарифицирование производили хирургическим ланцетом после анестезии лидокаином (1%); площадь скарификации составляла 4–7 мм². Противовирусную активность препаратов изучали по терапевтической схеме начиная через 1 или 48 ч после инфицирования. Препараты наносили методом аппликации местно на кожу пениса ежедневно 5 раз в день в течение 5 сут.

В первом эксперименте 20 инфицированных особей методом случайной выборки рандомизировали на 4 группы (по 5 морских свинок в каждой). Инфицированные животные через 3 ч после заражения получали: в первой группе – КГОСА (гель); во второй группе – препарат сравнения АЦВ (крем); в третьей группе – плацебо (основу геля КГОСА). Четвертая группа (позитивный контроль) содержала животных, инфицированных ВПГ-2 в дозе, эквивалентной такой, в опытных группах, и не получавших лечения.

Во втором опыте 30 морских свинок инфицировали ВПГ-2, после чего у них взяли смывы с урогенитальной области на предмет выделения вируса, оценки уровня его репликации и подтверждения специфичности симптомов ГГ. Затем животных рандомизировали методом случайной выборки на 6 групп (по 5 особей в каждой). Инфицированные особи спустя 48 ч после заражения получали: в первой группе – КГОСА (гель), во второй группе – препарат сравнения АЦВ (крем), в третьей – пенцикловир (крем), в четвертой – АИЛ (мазь); в пятой группе – плацебо (основу геля КГОСА). Шестая группа (позитивный контроль) содержала животных, инфицированных ВПГ-2 в той же дозе, что и в опытных группах, но не получавших лечения. В качестве контроля токсичности использовали интактных морских свинок (седьмая и восьмая группы), которых содержали в тех же условиях, что и животных в вышеупомянутых группах, и обрабатывали гелем КГОСА или его основой (плацебо) по аналогичной схеме. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 сут после заражения, ежедневно оценивая динамику развития и тяжесть ГГ с использованием шкалы баллов поражения в диапазоне от 0 до 4. При этом определяли выраженность специфических поражений (везикулы, пустулы, изъязвления, эрозии, корочки), наличие отёчности, гиперемии, признаков орхита, неврологической симптоматики (менингоэнцефалит, паралич), а также регистрировали изменения в общем состоянии и поведенческих реакциях животных, как описано нами ранее [23].

Эффективность КГОСА и препаратов сравнения оценивали на момент наибольшей выраженности патологического процесса по стандартной методике [16], также описанной нами ранее [23]. Учитывали следующие параметры: интенсивность клинических проявлений (в баллах); индекс лечебного действия (ИЛД); среднюю продолжительность заболевания (СПЗ); показатели инфекционной активности вируса в биоматериалах. Величину ИЛД вычисляли по формуле:

$$\text{ИЛД (в \%)} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (2),$$

где А – сумма баллов в контрольной группе, В – сумма баллов в группе животных, леченных препаратом.

При изучении влияния препаратов на уровень накопления вируса у инфицированных животных на 2, 5, 7, 9 и 11 сут после заражения брали смывы с урогенитальной области с использованием 0,5 мл стерильного физиологического фосфатного буфера (ФБР; PBS) с антибиотиками (100 ЕД/мл пенициллина и 80 мкг/мл гентамицина). Далее образцы биоматериала центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеточных элементов и слизи. Супернатант отбирали и до исследования хранили при $-70 \pm 10,0$ °С. Затем из него готовили серийные 10-кратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-7}) на ФБР, которыми заражали клетки культуры Vero.

На каждое 1 разведение исследуемого материала использовали 4 лунки. Инфекционную активность патогена в биоматериале определяли по общепринятым стандартам на культуре Vero в соответствии с описанным ранее протоколом [19].

Статистическая обработка данных. Результаты опытов подвергали статистической обработке общепринятыми для биологических исследований методами [20, 24] с применением пакетов прикладных программ Microsoft Excel 5.0 и STATISTICA 7.0. Полученные данные выражали в виде среднего значения (M) и стандартной ошибки (S_m) и подвергали тесту на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения для сравнения средних показателей применяли t-критерий Стьюдента. При ненормальном распределении результатов эксперимента обработку данных в дальнейшем осуществляли с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при величине p -уровня значимости $< 0,05$.

Результаты

Результаты изучения цитотоксического действия КГОСА на перевиваемой линии неинфицированных клеток Vero представлены в табл. 1. По данным световой микроскопии и теста с трипановым синим установлено, что вещество не оказывало цитотоксического действия на неинфицированные клетки. Жизнеспособ-

Таблица 1. Цитотоксическое действие КГОСА на перевиваемую линию неинфицированных клеток Vero

Table 1. Cytotoxic effect of OGCA on the continuous lineage of non-infected Vero cells

Концентрация Concentration	КГОСА OGCA		По данным метода световой микроскопии According to the light microscopy method	По данным метода исключения витального красителя According to the vital dye elimination method	
	Эквивалент концентрации образца по ацикловиру Equivalent of the sample concentration by aciclovir		Цитотоксическое действие Cytotoxic effect on cells	Цитотоксическое действие Cytotoxic effect	Количество живых клеток ¹ Number of living cells ¹
мкг/мл µg/ml	мкг/мл µg/ml		%	%	млн mln ($M \pm S_m$) ²
1000	160		<10,0	8,7	2,01 ± 0,36
500	80		0,0	0,6	2,03 ± 0,32
100	16		0,0	0,6	2,03 ± 0,30
50	8		0,0	0,5	2,01 ± 0,20
10	1,6		0,0	0,2	2,01 ± 0,25
5	0,8		0,0	0,2	2,05 ± 0,30
1	0,16		0,0	0,1	2,04 ± 0,25
0,5	0,08		0,0	0,1	2,01 ± 0,30
0,1	0,016		0,0	0,1	2,0 ± 0,27
среда Игла ³ Eagle's medium ³	0,0		0,0	0,0	2,05 ± 0,20

Примечание. ¹ определено методом исключения витального красителя трипанового синего;

² средние значения $\pm S_m$ по результатам 3 независимых опытов;

³ интактные клетки Vero служили в качестве контроля;

⁴ достоверность по отношению к контролю – клеткам Vero, инкубируемым в питательной среде ИГЛА, $p > 0,05$.

Note. ¹ was determined by the vital dye trypan blue elimination method;

² the average values $\pm S_m$ according to the results of three independent experiments;

³ intact Vero cells served as a control;

⁴ reliability in relation to the control – Vero cells incubated in the Eagle's minimal essential medium, $p > 0.05$.

способность клеток Vero, выращенных на средах, содержащих КГОСА в диапазоне концентраций от 1000 до 0,1 мкг/мл, составила 91,3–99,9% и достоверно не отличалась от таковой для клеточных элементов, инкубируемых в питательной среде Игла без препарата ($p > 0,05$).

Значение CC_{50} для КГОСА составило $>1000 \pm 110$ мкг/мл по сравнению с $>600 \pm 95$ мкг/мл для референс-препарата АЦВ.

В следующей серии экспериментов мы оценивали противовирусную активность КГОСА в отношении ГВИ в культуре Vero. Установлено, что препарат инги-

бирует репликацию как ВПГ-1, так и ВПГ-2. Параметры, характеризующие противовирусную активность исследуемого соединения и референс-препарата (CC_{50} , IC_{50} и IC_{90} , а также SI), представлены в табл. 2.

Эффективность противовирусного действия КГОСА на модели генитального герпеса у морских свинок. Анализ результатов свидетельствует о том, что КГОСА (3% гель) при использовании у морских свинок по лечебной схеме (местно пятикратно в течение 5 сут) обладает активностью в отношении ВПГ-2 штамма «ВН», выраженность которой зависит от сроков применения.

Таблица 2. Цитотоксическая и противовирусная активность КГОСА в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 в культуре клеток Vero

Table 2. Cytotoxic and antiviral activity of OGCA against HSV-1 and HSV-2 in Vero cell culture

Вирус Virus	КГОСА OGCA				Ацикловир Aciclovir			
	CC_{50}^1 ($M \pm S_m$), мкг/мл CC_{50}^1 ($M \pm S_m$), µg/ml	IC_{50}^2 ($M \pm S_m$), мкг/мл IC_{50}^2 ($M \pm S_m$), µg/ml	IC_{90}^3 ($M \pm S_m$), мкг/мл IC_{90}^3 ($M \pm S_m$), µg/ml	SI ⁴	CC_{50} ($M \pm S_m$), мкг/мл CC_{50} ($M \pm S_m$), µg/ml	IC_{50} ($M \pm S_m$), мкг/мл IC_{50} ($M \pm S_m$), µg/ml	IC_{90} ($M \pm S_m$), мкг/мл IC_{90} ($M \pm S_m$), µg/ml	SI
ВПГ-1, штамм «КЛ» HSV-1, K1 strain	$>1000 \pm 110^5$	2,6 ± 0,1	8,0 ± 0,3	384,6	$>600 \pm 95$	1,2 ± 0,1	3,2 ± 0,2	500
ВПГ-2, штамм «ВН» HSV-2, VN strain		5,5 ± 0,2 ⁵	24,4 ± 0,8	181,2		1,7 ± 0,2	6,3 ± 0,7	352,9

Примечание. ¹ CC_{50} мкг/мл – 50% цитотоксическая концентрация препарата;

² IC_{50} – 50% ингибирующая концентрация препарата;

³ IC_{90} – 90% ингибирующая концентрация препарата;

⁴SI – селективный индекс;

⁵значения $M \pm S_m$ по результатам 3 независимых опытов с использованием каждого типа вируса.

Note. ¹ CC_{50} , 50% cytotoxic concentration of the drug;

² IC_{50} , 50% inhibitory concentration of the drug;

³ IC_{90} , 90% inhibitory concentration of the drug;

⁴SI, selective index;

⁵values of $M \pm S_m$ according to the results of three independent experiments using each type of virus.

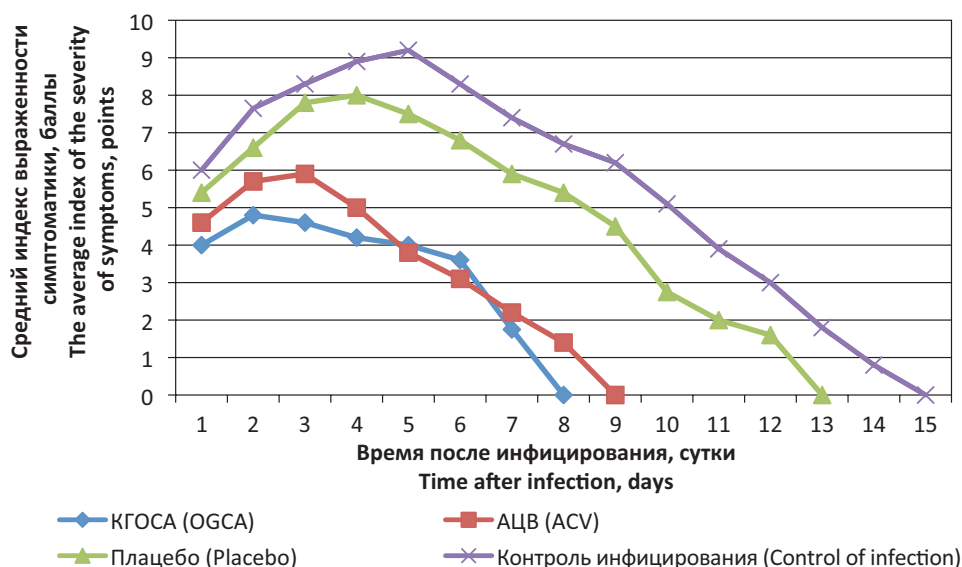


Рис. 2. Влияние КГОСА на течение герпесвирусной инфекции у самцов морских свинок при использовании через 3 ч после инфицирования.

Примечание. Здесь и на рис. 3 по оси абсцисс – время после инфицирования, сутки; по оси ординат – средний индекс выраженности, баллы.

Fig. 2. The effect of OGCA on the course of herpesvirus infection in male guinea pigs when applied 3 hours after infection.

Note. Here and in Fig. 3 the X-axis shows the time after infection (days), Y-axis shows the average index of the severity of symptoms, points.

Наиболее выраженные результаты получены в группе инфицированных животных, получавших КГОСА (3% гель) в ранние сроки – через 3 ч после инфицирования (табл. 3, рис. 2). Применение препарата приводило у них к значимому (приблизительно в 2,3 раза) снижению суммарного индекса выраженности симптоматики (СИВС) по сравнению с особями, не получавшими лечения или получавшими плацебо, а также к достоверному укорочению СПЗ на 6,3 сут в сравнении с группой без лечения ($p < 0,001$) и на 4,5 сут – с группой плацебо ($p < 0,05$).

Несмотря на то что КГОСА обладал более быстрым началом действия относительно ацикловира (уменьшение СИВС наблюдалось уже через 1 сут после начала применения, рис. 2), на 5 сут после инфицирования выраженность симптоматики у животных, получавших исследуемые препараты, достоверно не различалась (20 против 19 баллов у АЦВ, $p > 0,05$).

Эффективность применения КГОСА была сопоставима с таковой для 5% крема АЦВ (ИЛД – 56,5 и 58,7% соответственно, $p > 0,05$).

У животных, получавших КГОСА или АЦВ, зарегистрированы уменьшение частоты и сокращение числа дней выделения вируса, а также снижение уровня его инфекционной активности в сравнении с группами контроля и плацебо. Так, на 5 сут наблюдения на фоне лечения обоими препаратами возбудитель был выделен только у 40% (2/5) животных, в то время как в группах контроля – у 100% (5/5). КГОСА, так же как и АЦВ, эффективно ингибировал репликацию ВПГ-2 у инфицированных особей, о чём свидетельствовало снижение титров вируса в урогенитальных смывах на 1,75–2,0 lg ТЦИД₅₀ ($p < 0,001$) по сравнению с таковыми в группах без лечения и на 1,25–1,5 lg ТЦИД₅₀ ($p < 0,05$) – среди получавших плацебо. На 7 сут после заражения происходило дальнейшее снижение титров

Таблица 3. Противовирусная активность КГОСА (гель 3%) в отношении ВПГ-2 (штамм «ВН») на модели генитального герпеса у морских свинок

Tabl. 3. Antiviral activity of OGCA (gel 3%) against HSV-2 (VN strain) on the model of genital herpes in guinea pigs

Группа животных, $n = 5^1$ Group of animals, $n = 5^1$	Средняя продолжительность заболевания (СПЗ), сут, ($M \pm S_m$) ² Average duration of the disease (ADD), days ($M \pm S_m$) ²	Суммарный индекс выраженности симптоматики, баллы The total index of the severity of symptoms, points	Средний индекс выраженности симптоматики, баллы, ($M \pm S_m$) The average index of the severity of symptoms, points	Индекс лечебного действия (ИЛД), % Index of therapeutic effect (ITE)	Титры вируса, ($M \pm S_m$) ⁴ , lg ТЦИД ₅₀ /0,1 мл Virus titers ($M \pm S_m$) ⁴ , lg TCID ₅₀ /0,1 ml
Лечебная схема: через 3 ч после заражения ежедневно в течение 5 дней пятикратно Treatment regimen: 3 hours after infection, five times daily for 5 days					
КГОСА OGCA	7,8 ± 1,5*	20,0 ³	4,0 ± 0,5	56,52*	3,25 ± 0,15*
Ацикловир Aciclovir	9,2 ± 1,75*	19,0 ³	3,8 ± 1,0	58,69*	3,0 ± 0,2*
Плацебо (основа геля) Placebo (gel base)	12,3 ± 1,4	37,5	7,5 ± 0,25	18,47	4,5 ± 0,16
Контроль инфицирования Infection control	14,1 ± 1,5	46,0	9,2 ± 0,75		5,0 ± 0,11
Лечебная схема: через 48 ч после заражения ежедневно в течение 5 дней пятикратно Treatment regimen: 48 hours after infection, five times daily for 5 days					
КГОСА OGCA	9,8 ± 1,5*	24,0 ³	4,8 ± 0,56 ³	47,8*	3,5 ± 0,1*
Ацикловир Aciclovir	10,5 ± 2,0*	28,13 ³	5,6 ± 0,68 ³	38,86*	3,4 ± 0,3*
Пенцикловир Penciclovir	9,5 ± 1,52*	27,5 ³	5,5 ± 1,0 ³	40,21*	3,0 ± 0,25*
АИЛ Ail	10,3 ± 1,35*	30,0 ³	6,0 ± 1,0 ³	34,78*	3,75 ± 0,2*
Плацебо (основа геля) Placebo (gel base)	14,0 ± 1,5	39,5	7,9 ± 0,25	14,1	4,9 ± 0,3
Контроль инфицирования Infection control	15,3 ± 1,25	46,0	9,2 ± 0,75		5,25 ± 0,16

Примечание. ¹ n – число животных в каждой группе = 5;

² M – среднее арифметическое, S_m – стандартное отклонение;

*отличие относительно животных группы контроля статистически значимо ($p < 0,05$, U -критерий Манна–Уитни);

³отличие относительно животных группы контроля статистически значимо ($p < 0,05$, t -критерий Стьюдента);

⁴уровень накопления вируса в смывах с урогенитальной области, взятых на 5 сут после заражения;

ТЦИД₅₀ – тканевая цитопатическая инфекционная доза.

Note. ¹ n , the number of animals in each group is 5;

² M , the arithmetic mean; S_m - the standard deviation;

* – the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ($p < 0.05$, U – the the Mann–Whitney criterion);

³the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ($p < 0.05$, t – the Student’s criterion);

⁴the level of virus accumulation in flushes from the urogenital region taken on the 5th day after infection;

TCID₅₀, tissue culture infectious dose.

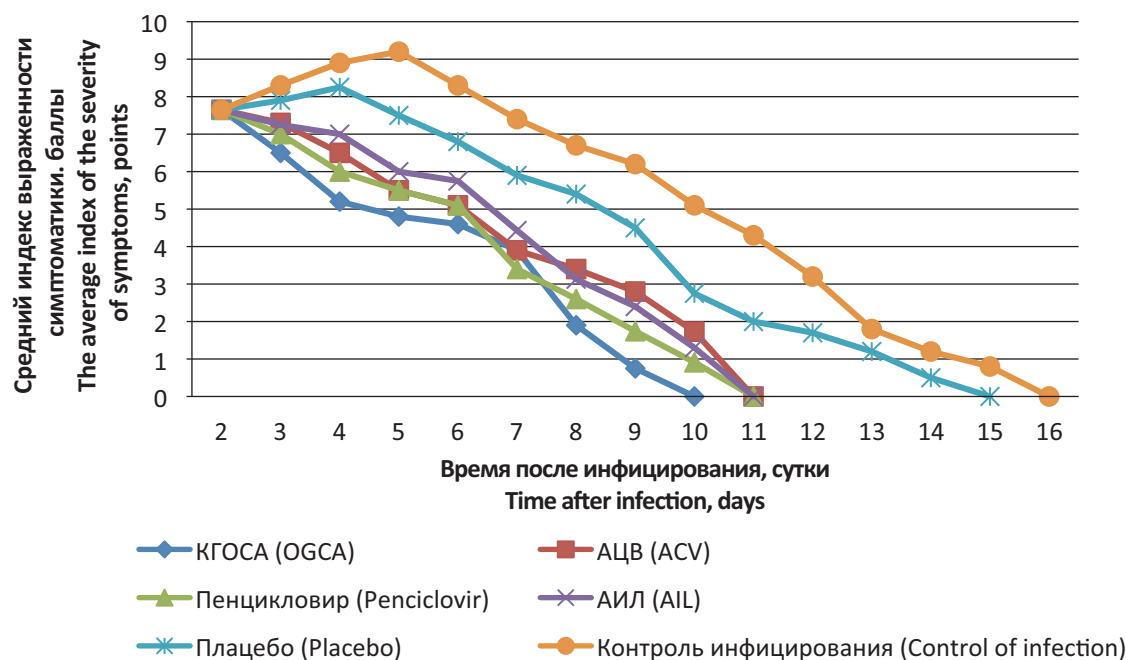


Рис. 3. Влияние КГОСА на течение герпесвирусной инфекции у самцов морских свинок при использовании через 48 ч после инфицирования.

Fig. 3. The effect of OGCA on the course of herpesvirus infection in male guinea pigs when applied 48 hours after infection.

вируса во всех группах, в т.ч. у 80% (4/5) контрольных животных и у 60% (3/5) – в группе плацебо до $3,0 \pm 0,2 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$ и у 20% (1/5) особей, получавших КГОСА или АЦВ, – до $1,5 \pm 0,1 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$ ($p < 0,05$ в сравнении с контролем). Позже 7 сут от момента инфицирования вирус не был выделен ни у одного животного, получавшего КГОСА или АЦВ.

Несмотря на то, что применение основы геля КГОСА 5 раз в день на протяжении 5 сут приводило к снижению СПЗ на 1,8 сут и определённому терапевтическому эффекту (ИЛД 18,47 баллов) по сравнению с аналогичными показателями у инфицированных животных, не получавших лечения, его выраженность не достигала статистической значимости ($p > 0,05$). Также не установлено достоверного влияния плацебо на уровень репликации вируса в урогенитальной области ($p > 0,05$). Данный факт свидетельствует о том, что основа геля КГОСА не обладает противовирусной активностью. В то же время её использование приводило к уменьшению выраженности воспалительных изменений у инфицированных животных, что, по-видимому, обусловлено входящими в её рецептуру компонентами.

Лечение с использованием КГОСА, начатое спустя 48 ч после заражения, у животных с выраженными симптомами ГГ (наличие везикул, гиперемии, отёка) воспроизводит клиническую ситуацию, при которой пациент с теми или иными признаками заболевания обращается за медицинской помощью. В условиях данного эксперимента у 30 инфицированных особей перед рандомизацией был проведён анализ смывов с очагов поражения, подтвердивший специфичность симптомов ГГ и позволивший разделить подопытных на равнозначные группы. Результаты отсроченного применения КГОСА

и референс-препаратов у инфицированных животных представлены в **табл. 3** и на **рис. 3**.

На фоне терапии КГОСА у животных с выраженными проявлениями ГГ отмечено замедление прогрессирования симптомов заболевания уже через 1 сут от начала медикаментозного вмешательства (**рис. 3**) по сравнению как с получавшими референс-препараты/плацебо, так и с особями без лечения. На 5 сут после заражения КГОСА превосходил по влиянию на выраженность симптоматики и значению ИЛД все используемые в опыте референс-препараты. Несмотря на то что величина ИЛД в случае КГОСА превышала таковую для препарата АЦВ на 8,94%, а для пенцикловира – на 7,59%, данные различия не были достоверными ($p > 0,05$), в то время как различия по этому параметру с комбинированным препаратом АИЛ на 13,02% оказались статистически значимыми ($p < 0,05$). Следует отметить, что КГОСА по влиянию на СПЗ у инфицированных особей был сопоставим с референс-препаратами. Так, 3% крем АЦВ и мазь АИЛ достоверно снижали СПЗ с $15,3 \pm 1,25$ сут (без лечения) в среднем до 10,4 сут, а 1% крем Пенцикловир – до $9,5 \pm 1,5$ сут. Значимых различий между показателями эффективности КГОСА в виде геля для наружного применения и референс-препаратов (АЦВ, пенцикловир) по влиянию на динамику инфекционного процесса и СПЗ не было выявлено. Несмотря на то что применение основы геля КГОСА приводило к определённому терапевтическому воздействию (ИЛД 14,1%) и снижению СПЗ до $14,0 \pm 1,5$ сут, по выраженности лечебного эффекта оно уступало как КГОСА, так и референс-препаратам.

Для оценки влияния отсроченной терапии КГОСА на частоту и продолжительность выделения ВПГ-2, а также уровень его репликации у инфицированных животных проведено изучение образцов смывов, взятых с очагов поражения, с использованием стандартной методики на культуре клеток Vero. Результаты представлены в табл. 4 и на рис. 4.

Установлено, что через 5 сут после заражения у животных в группах контроля и плацебо частота выделения вируса не изменилась по сравнению со 2-ми сут после заражения и составила 100% (рис. 4). В то же время среди подопытных, получавших КГОСА или содержащие АЦВ препараты, этот показатель снизился со 100 до 60%, а у получавших пенцикловир – до 40%. Через 7 сут после инфицирования во всех группах наблюдали дальнейшее снижение частоты выделения вируса, наиболее выраженное у особей, получавших КГОСА или референс-препараты (20% против 80 и 60% у животных в группах контроля или плацебо соответственно, $p < 0,05$).

Способность препарата сокращать период вирусывыделения служит одним из важных факторов контроля за распространением инфекционного агента. Исследование показало, что терапия как КГОСА, так и референс-препаратами приводила к достоверному сокращению (на 2 сут) времени выделения вируса у инфицированных животных по сравнению с не получавшими лечения/получавшими плацебо, у которых вирус обнаруживался в очагах поражения на протяжении 9 сут.

При отсроченном применении КГОСА эффективно ингибировал репликацию ВПГ-2 у инфицированных особей, о чём свидетельствуют данные, представленные в табл. 4.

Поскольку ГГ является самолимитирующейся инфекцией, то через 5 сут после заражения частота выделения вируса и его инфекционная активность снизились во всех группах. У животных, получавших КГОСА, значение последнего параметра уменьшилось по сравнению со 2-ми сут после заражения в среднем в 5 раз (с $4,25$ до $3,5$ lg ТЦИД₅₀/0,1 мл) и было сопоставимо с таковым у референс-препаратов АЦВ и АИЛ. Наиболее существенное снижение инфекционной активности вируса – на $1,25$ lg ТЦИД₅₀ – выявлено среди особей, получавших Пенцикловир.

Через 7 сут после заражения инфекционная активность вируса у морских свинок на фоне лечения КГОСА снизилась более чем в 10 раз по сравнению с предыдущим периодом исследования и была сопоставима с определяемой в образцах смывов у инфицированных животных, получавших референс-препараты. Спустя 9 сут возбудитель был выделен из смывов с урогенитальной области только у 40% (2/5) животных в группе контроля и у 20% (1/5) – в группе плацебо с инфекционной активностью, равной в среднем $1,83 \pm 0,18$ lg ТЦИД₅₀/0,1 мл (табл. 4, рис. 4). Изучение образцов смывов с очагов поражений, взятых у инфицированных особей позже указанного срока, как и в первом эксперименте, не выявило наличия вируса ни у одного животного во всех группах.

Таким образом, в опытах по изоляции и титрованию вируса из образцов биоматериала у инфицированных животных с ГГ в культуре клеток Vero нами получены данные о наличии у 3% геля КГОСА противовирусной активности в отношении ВПГ-2. Эти результаты сопоставимы с интенсивностью проявлений ГГ у инфицированных моделей.

Таблица 4. Влияние КГОСА на инфекционную активность ВПГ-2, выделенного из очагов поражения у инфицированных морских свинок* (по данным вирусологического метода)

Table 4. The effect of OGCA on the infectious activity of HSV-2 isolated from lesions in infected guinea pigs* (using the virological method)

Группа животных Group of animals	Число животных в группе, <i>n</i> Number of animals in the group, <i>n</i>	Дни после инфицирования Days after infection				
		2	5	7	9	11
		Титры вируса у животных с выделением вируса ($M \pm S_m$), lg ТЦИД ₅₀ /0,1 мл Virus titers in animals with virus shedding ($M \pm S_m$), lg TCID ₅₀ /0,1 ml				
КГОСА гель OGCA gel	5		$3,5 \pm 0,2^3$	$2,25 \pm 0,25^3$	0	0
Ацикловир крем Aciclovir cream	5		$3,4 \pm 0,11^3$	$2,0 \pm 0,4^3$	0	0
Пенцикловир крем Penciclovir cream	5	$4,25 \pm 0,1^1$ (<i>n</i> = 30)	$3,0 \pm 0,4^3$	$1,75 \pm 0,11^3$	0	0
АИЛ мазь Ail ointment	5		$3,75 \pm 0,15^3$	$2,5 \pm 0,2^2$	0	0
Плацебо (основа геля КГОСА) Placebo (OGCA gel base)	5		$4,9 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$	$1,65 \pm 0,1$	0
Контроль инфицирования Infection control	5		$5,25 \pm 0,25$	$3,75 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,25$	0

Примечание. ¹титры вируса у 30 инфицированных животных перед началом лечения (через 48 часов после заражения);

²различие относительно животных группы контроля статистически значимо ($p < 0,05$, *U*-критерий Манна–Уитни);

³различие относительно животных группы контроля статистически значимо ($p < 0,05$, *t*-критерий Стьюдента);

* – животные с выделением вируса.

Note. ¹virus titers in 30 infected animals before starting treatment (48 hours after infection);

²the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ($p < 0.05$, *U* – the Mann–Whitney criterion);

³the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ($p < 0.05$, *t* – the Student's criterion);

*, animals with virus shedding.

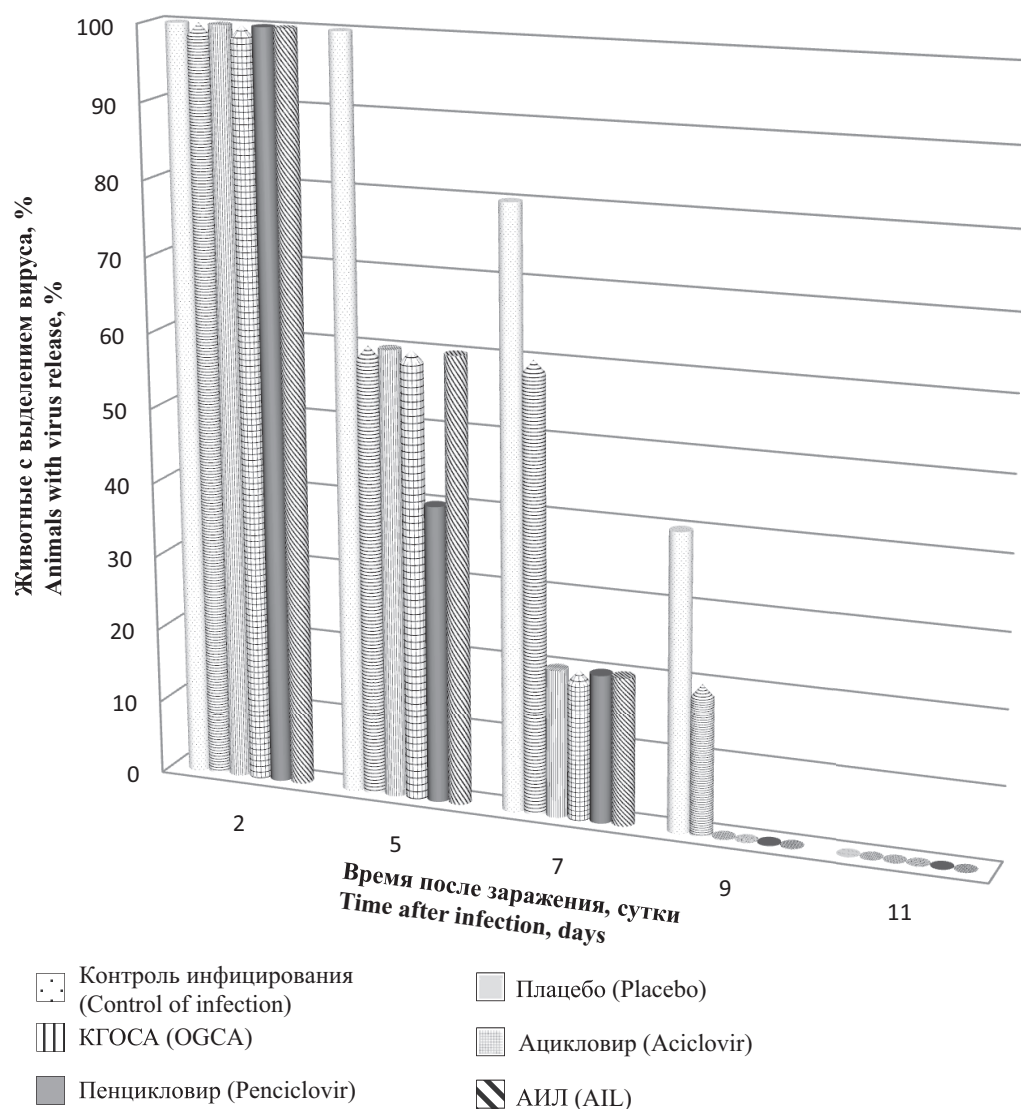


Рис. 4. Влияние КГОСА (3% гель) на частоту выделения вируса из очагов поражения у самцов морских свинок, инфицированных ВПГ-2 (по данным вирусологического метода).

Примечание. По оси абсцисс – время после заражения, сутки; по оси ординат – доля животных с выделением вируса, %.

Fig. 4. The effect of OGCA (3% gel) on the frequency of virus isolation from lesions in male guinea pigs infected with HSV-2 (according to the virological method).

Note. X-axis shows the time after infection (days), Y-axis shows the proportion of animals with virus shedding, percentage.

Контроль токсичности. Ежедневный осмотр неинфицированных животных, которым наносили на кожу пениса исследуемый гель КГОСА или его основу 5 раз в день в течение 5 сут, показал, что исследуемый препарат и его гелевая основа не обладали раздражающим действием и не оказывали каких-либо видимых побочных эффектов на протяжении всего периода наблюдения. Изменений в поведении и общем состоянии не выявлено ни у одного животного; ни в одном случае не зарегистрировано также наличия покраснения, отёка, зуда, явлений дерматита.

Обсуждение

В настоящее время основное направление в лечении ГВИ, в том числе и ПГ, подразумевает приме-

нение этиотропных препаратов из группы ациклических нуклеозидов [2, 5, 6]. Одним из наиболее используемых является АЦВ, применяемый в зависимости от клинической формы инфекции и степени её тяжести перорально, парентерально либо местно [2, 5–8]. Хотя АЦВ – эффективное средство терапии ГВИ, его эмпирическое назначение не всегда оказывается успешным [2, 5, 6], так как не исключает рецидивирования заболевания, бессимптомного вирусыведения, не позволяет провести эрадикацию возбудителя, устранить иммунные нарушения [2] или предотвратить формирование штаммов ВПГ с изменёнными свойствами, устойчивыми к действию препарата [2, 6–8]. Среди значимых причин недостаточной эффективности терапии АЦВ следует отметить

его низкую всасываемость в желудочно-кишечном тракте в результате гидрофильности и невысокой пероральной биодоступности, малую растворимость в воде, сниженную трансдермальную диффузию при использовании топических форм и т.д. [2, 5, 7].

Одним из перспективных подходов к повышению биофармацевтических характеристик АЦВ является синтез его производных по принципу «*me-too drug*», которые легче проникают в клетку и превращаются в ней в целевое вещество, подавляющее размножение ВПГ, а также имеют повышенную биодоступность. Примером таких химически модифицированных пролекарств АЦВ являются валацикловир и фамцикловир [2, 6, 11]. В данной работе нами представлены результаты изучения активности КГОСА (синтезированного в соответствии с указанным принципом) – нового комплексного германий-органического соединения АЦВ.

Из данных литературы известно, что возбудителем ГГ может быть не только ВПГ-2, но и в 30% случаев – ВПГ-1 [3,4], поэтому в настоящем исследовании мы оценивали противовирусную активность КГОСА с использованием нескольких типов ВПГ. Установлено, что вещество *in vitro* эффективно ингибирует вирусную репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2, обладая сравнимой с референс-препаратом АЦВ активностью и не проявляя явной цитотоксичности в концентрации >1000 мкг/мл. Результаты, полученные *in vitro* в отношении ВПГ, в дальнейшем были подтверждены *in vivo* у самцов морских свинок на модели ГГ, вызванного ВПГ-2. Такая модель в настоящее время считается клинически релевантной ситуации у человека, поскольку имитирует различные периоды развития заболевания [16]. Нами показано, что КГОСА (гель 3%) при местном использовании по лечебной схеме обладает достоверной противовирусной активностью в отношении ВПГ-2, выраженность которой зависит от времени его применения. Наиболее значимые результаты получены при его использовании в ранние сроки – через 3 ч после заражения. У инфицированных животных препарат приводил к значимому замедлению прогрессирования симптомов ГГ и снижению СИВС, сокращению продолжительности заболевания по сравнению как с инфицированными особями без лечения, так и с получавшими плацебо (основу геля КГОСА). Установлено также, что КГОСА эффективно снижал репликацию ВПГ, уменьшал частоту и сокращал продолжительность выделения вируса из урогенитальных путей, что согласуется с исходами заболевания у морских свинок, а также может иметь значение для контроля за распространением возбудителя. По эффективности КГОСА оказался сопоставимым с препаратом сравнения АЦВ (крем 5%). Следует отметить, что полученные нами результаты согласуются с данными Е. Керн и соавт. [25], показавших, что у мышей, интравагинально инфицированных ВПГ-2, лечение 1% и 5% АЦВ в виде мази или геля, начатое в ранние сроки (через 3, 6 или 24 ч) после заражения, снижало репликацию вируса, уменьшало тяжесть первичного заболевания и смертность. Описаны положительные эффекты местной терапии ГГ комбинированным препаратом АЦВ в сочетании с IFN

(АИЛ) также при использовании в ранние сроки после инфицирования [2]. Кроме того, у пациентов с этой локализацией герпетического поражения эффективность терапии намного выше, если она начата в первые 24–48 ч от появления начальных признаков заболевания [2].

Лечение с использованием КГОСА, начатое через 48 ч после заражения, у животных с выраженными симптомами ГГ воспроизводило клиническую ситуацию, когда пациент с теми или иными проявлениями заболевания обращается за медицинской помощью. При отсроченном применении (через 48 ч после заражения) препарат подавлял симптомы ГГ и ингибировал репликацию ВПГ-2 у морских свинок так же эффективно, как и препараты сравнения, содержащие АЦВ (АЦВ крем, АИЛ мазь), или пролекарство пенцикловира (Пенцикловир крем). На фоне терапии КГОСА выявлены снижение уровня инфекционной активности вируса, уменьшение частоты и сокращение продолжительности его выделения, что, в свою очередь, подтверждает наличие у препарата противовирусной активности в отношении ВПГ-2.

Что же касается эффективности отсроченного лечения АЦВ, то, по данным Е. Керн и соавт. [25] у мышей, интравагинально инфицированных ВПГ-2, применение 5% АЦВ в виде мази или геля спустя 48–72 ч после заражения приводило к значительному снижению вирусной нагрузки, уменьшению тяжести заболевания, но не влияло на исход ГГ в плане показателей смертности. В то же время в другой работе [26] показана выраженная активность 5% ацикловира монофосфата, 5% крема АЦВ и в меньшей степени 1% крема пенцикловира в отношении ВПГ-1 при орофациальной инфекции у мышей и АЦВ-чувствительного/АЦВ-резистентного ВПГ-2 у инфицированных морских свинок, когда лечение было начато через 24, 48 или 72 ч после заражения.

Как известно, у инфицированных ВПГ людей возможно спонтанное выделение вируса независимо от наличия активной симптоматики; таким образом, вероятность передачи возбудителя является важной проблемой для пациентов с ГГ и их партнёров, в особенности в дискордантных парах [2]. Хотя АЦВ уменьшает репликацию вируса в половых путях, он не способен полностью прекратить его выделение даже на фоне проведения супрессивной терапии [2]. Ранее В.Л. Андроновой и соавт. [27] на модели ВПГ-1-генитальной инфекции у морских свинок показано, что титры вируса в урогенитальных смывах не изменялись после лечения мазью АЦВ или мазью фосфит ациклогуанозина [27]. В настоящем исследовании мы установили, что КГОСА значимо уменьшал инфекционную активность ВПГ-2 и частоту его выделения.

Несмотря на то что в последние годы ведётся активный поиск новых лекарственных средств для лечения ГВИ, интерес к совершенствованию методик и схем применения АЦВ (в частности, топической формы), а также создание его новых модификаций и фармакологических форм не теряют своей актуальности. Мишенью для АЦВ (при местном применении) служит базальный эпидермис. Тем не менее традиционная топиче-

ская терапия препаратом имеет низкую эффективность, обусловленную отсутствием проникновения достаточного его количества в целевой участок кожи. Известно, что количество АЦВ, попадающее после применения 5% крема в базальный слой эпидермиса, составляет всего 30–50% от концентрации, достижимой приёмом внутрь [2]. Одной из причин снижения трансдермальной диффузии АЦВ является охарактеризованная ранее его низкая растворимость в воде. В настоящее время наряду с получением различных модификаций АЦВ проводятся исследования по созданию его новых топических форм (микро-, нанонизированных и т.д.), способных повысить биодоступность вещества, обеспечить его адекватную концентрацию в целевом участке кожи для эффективного подавления репликации ВПГ [29]. На основе указанной технологии разработаны комбинированные препараты, в частности содержащие АЦВ и противовоспалительные соединения – гидрокортизон (крем) [9], кетоконазол (крем, гель, бальзам для губ) [10] либо АЦВ и IFN (мазь) [2], которые применяются в основном для лечения herpes labialis. Ведутся работы по созданию трансмукозальных лекарственных форм АЦВ (гель, крем, бальзам для губ), способных обеспечить проникновение достаточного количества препарата в целевой участок кожи [10]. Рядом исследователей продемонстрировано преимущество использования гелевой основы для разработки топической формы АЦВ в связи с её наибольшей (по сравнению с кремом или бальзамом) проницаемостью через слизистую оболочку [10, 27].

В исследовании K. Rajroot [28] предлагается новый подход к повышению пенетрации АЦВ путём синтеза наноэмульсионной органогелевой системы (органогеля на основе сложных эфиров сорбита, нагруженного молекулами АЦВ), которая в эксперименте показала высокую гелеобразующую способность и эффективность по отношению к ВПГ. В креме Пенцикловир улучшение пенетрации активного вещества достигнуто введением в рецептуру пропиленгликоля и цетмакрогола 1000, которые облегчают проникновение пенцикловира через кожу, стабилизируют компоненты препарата и пролонгируют их действие в инфицированной клетке на протяжении >12 ч [2, 11]. Поэтому при местном нанесении лекарственное средство быстро диффундирует через верхние слои кожи. Пенцикловир быстро переходит в пенцикловира трифосфат, обладающий фармакологической активностью и блокирующий репликацию ВПГ [2, 11]. Данные, полученные в нашей работе относительно активности крема Пенцикловир в отношении ВПГ-2 при использовании через 48 ч после заражения у морских свинок, объясняются именно этим феноменом.

В геле КГОСА проблема повышения биодоступности и проникновения активного вещества решена несколько иначе, чем в приведённых выше случаях. Гель представляет собой пространственно-структурированную водную систему, содержащую 3% комплексного германийорганического соединения АЦВ. Введение в молекулу германийорганического комплекса позволило снизить концентрацию исходного вещества (АЦВ) и из-

менить биофармацевтические характеристики препарата. В частности, достигнуто увеличение растворимости КГОСА в воде (>25% против 0,13% у АЦВ) во всём физиологическом диапазоне pH (в отличие от низкой растворимости АЦВ при pH 4,4–4,5 и 6,8), а также в биорелевантных средах. Вспомогательные вещества, входящие в рецептуру геля (пропиленгликоль, ксилитол, гидроксипропилцеллюлоза, натрия альгинат, полисорбат, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) и др.), обеспечивают ускорение пенетрации КГОСА через верхние слои кожи, стабильность специфической активности и надлежащую микробиологическую чистоту препарата. Включение в состав геля пропиленгликоля позволило ускорить проникновение молекул активного вещества вглубь кожи. Пропиленгликоль представляет собой двухатомный спирт; он нетоксичен, используется как гигроскопическое вещество (увлажнитель), растворитель, стабилизатор и консервант, обладает бактерицидными свойствами, что позволяет минимизировать количественный состав ингредиентов основы. Гелевая основа (не обладающая способностью ингибировать репликацию ВПГ) способствует ускорению пенетрации КГОСА в средние слои эпидермиса, потенцирует лечебное действие вещества, а также снижает выраженность экссудативно-воспалительных проявлений ГГ. Благодаря составляющим гелевой основы КГОСА при нанесении на кожу образует защитную прозрачную микроплёнку, создающую воздухопроницаемую микросреду для ускоренной регенерации повреждённых тканей, а также способствует уменьшению жжения, зуда, выраженности отёчности и других симптомов.

Заключение

Результаты исследования показывают, что комплексное германийорганическое соединение АЦВ ингибирует репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2 в клетках культуры Vero и обладает анти-ВПГ-2-активностью на модели ГГ у морских свинок, приводящей к снижению выраженности симптоматики, тяжести и продолжительности заболевания, снижению инфекционной активности вируса и продолжительности его выделения. Полученные данные позволяют рассматривать КГОСА в качестве основы для разработки средств для лечения ГВИ, обладающих противовирусной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. *Herpes Simplex Viruses*. In: Knipe D.M., Howley P.M., Cohen J.I., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1823–97.
2. Исаков В.А., ред. *Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей*. СПб.: СпецЛит; 2013.
3. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident Herpes Simplex Virus type 1 infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0140765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>
4. James C, Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M.E., Abu-Raddad L.J., Gottlieb S.L., et al. Herpes Simplex Virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ*. 2020; 98(5): 315–29. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
5. Whitley R., Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present and future. *F1000Res*. 2018; 7: 1726. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16157.1>

6. James S.H., Prichard M.N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. *Curr. Opin. Virol.* 2014; 8: 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.003>
7. Piret J., Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2016; 29(6): 654–62. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000288>
8. Burrell S., Aime C., Hermet L., Ait-Arkoub Z., Agut H., Boutolleau D. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: a 4-year survey. *Antiviral Res.* 2013; 100(2): 365–72. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.012>
9. Vere Hodge R.A., Field H.J. Antiviral agents for herpes simplex virus. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 1–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00001-9>
10. Viljoen J.M., Botes D., Steenekamp J.H. Formulation and evaluation of selected transmucosal dosage forms containing a double fixed-dose of acyclovir and ketoconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018; 111: 503–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.10.033>
11. Birkmann A., Zimmermann H. HSV antivirals – current and future treatment options. *Curr. Opin. Virol.* 2016; 18: 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.013>
12. Исаев А.Д., Манашеров Т.О., Амбросов И.В., Матело С.К. Комплексные соединения германия с производными азотистых оснований пуринового ряда, способы их получения и содержащие их лекарственные средства. Патент РФ RU2487878C1; 2013.
13. Комаров Б.А., Зеленков В.Н., Погорельская Л.В., Албулов А.И. Элемент германий и биологическая активность его соединений. В кн.: *Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты*. М.; 2016: 169–78.
14. Sekhon B.S. Metalloid compounds as drugs. *Res. Pharm. Sci.* 2013; 8(3): 145–58.
15. Cho J.M., Chae J., Jeong S.R., Moon M.J., Shin D.Y., Lee J.H. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. *PLoS One.* 2020; 19: 15(10): e0240358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240358>
16. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлёва М.В., Лепяхин В.К., и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I*. М.: Гриф и К; 2012.
17. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene.* 1938; 27: 493–7.
18. 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. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(02\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(02)00127-3)
19. 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): 228–36. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236>
20. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. *Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований*. СПб.: ВМедА; 2002.
21. Cotarello M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Menasalvas A., Cerenado E., Tenorio A., et al. Cytotoxic effect inhibition assay for determining the in vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 44(5): 705–8. <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
22. Kruppenbacher J.P., Klass R., Eggers H.J. A rapid and reliable assay for testing acyclovir sensitivity of clinical herpes simplex virus isolates independent of virus dose and reading time. *Antiviral Res.* 1994; 23(1): 11–22. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90029-9)
23. Novoselova E.A., Alimbarova L.M., Monakhova N.S., Lepioshkin A.Yu., Ekins S., Makarov V.A. In vivo activity of pyrimidine-dispirotriperazine in the male guinea pig model of genital herpes. *J. Virol. Antivir. Res.* 2020; 9(1). [https://doi.org/10.37532/jva.2020.9\(1\).193](https://doi.org/10.37532/jva.2020.9(1).193)
24. Пшеничников В.А., Семёнов Б.Ф., Зезеров Е.Г. *Стандартизация методов вирусологических исследований*. М.: Медицина; 1974.
25. Kern E.R., Richards J.T., Overall J.C., Glasgow L.A. Acyclovir treatment of experimental genital herpes simplex virus infections. I. Topical therapy of type 2 and type 1 infections of mice. *Antiviral Res.* 1983; 3(4): 253–67. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(83\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(83)90004-9)
26. Kern E.R., Palmer J., Szczech G., Painter G., Hostetler K.Y. Efficacy of topical acyclovir monophosphate, acyclovir, or penciclovir in orofacial HSV-1 infections of mice and genital HSV-2 infections of guinea pigs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2000; 19(1-2): 501–13. <https://doi.org/10.1080/15257770008033024>
27. Андропова В.Л., Ясько В.М., Куханова М.К., Галегов Г.А., Скоблов Ю.С., Кочетков С.Н. Антигерпесвирусная эффективность фосфата ациклогуанозина, преодолевающего барьер резистентности к ацикловиру. *Acta Naturae.* 2016; 8(1): 81–8.
28. Rajpoot K. Acyclovir-loaded sorbitan esters-based organogel: development and rheological characterization. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017; 45(3): 551–9. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1161639>
29. Rodrigues L.N.C., Zanluchi J.M., Grebogi I.H. Percutaneous absorption enhancers: Mechanisms and potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2007; 50(6): 949–61. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000700006>

REFERENCES

1. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. *Herpes Simplex Viruses*. In: Knipe D.M., Howley P.M., Cohen J.I., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1823–97.
2. Isakov V.A., ed. *Human Herpesvirus Infections: A Guide for Physicians [Gerpesvirusnye infektsii cheloveka: rukovodstvo dlya vrachey]*. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
3. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident Herpes Simplex Virus type 1 infections in 2012. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>
4. James C, Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M.E., Abu-Raddad L.J., Gottlieb S.L., et al. Herpes Simplex Virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* 2020; 98(5): 315–29. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
5. Whitley R., Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present and future. *F1000Res.* 2018; 7: 1726. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16157.1>
6. James S.H., Prichard M.N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. *Curr. Opin. Virol.* 2014; 8: 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.003>
7. Piret J., Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2016; 29(6): 654–62. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000288>
8. Burrell S., Aime C., Hermet L., Ait-Arkoub Z., Agut H., Boutolleau D. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: a 4-year survey. *Antiviral Res.* 2013; 100(2): 365–72. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.012>
9. Vere Hodge R.A., Field H.J. Antiviral agents for herpes simplex virus. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 1–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00001-9>
10. Viljoen J.M., Botes D., Steenekamp J.H. Formulation and evaluation of selected transmucosal dosage forms containing a double fixed-dose of acyclovir and ketoconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018; 111: 503–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.10.033>
11. Birkmann A., Zimmermann H. HSV antivirals – current and future treatment options. *Curr. Opin. Virol.* 2016; 18: 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.013>
12. Isaev A.D., Manashеров Т.О., Амбросов И.В., Матело С.К. Комплексные соединения германия с производными азотистых оснований пуринового ряда, способы их получения и содержащие их лекарственные средства. Патент РФ RU2487878C1; 2013. (in Russian)
13. Комаров Б.А., Зеленков В.Н., Погорельская Л.В., Албулов А.И. Элемент германий и биологическая активность его соединений. In: *Unconventional Natural Resources, Innovative Technologies and Products [Element germaniy i biologicheskaya aktivnost' ego soedineniy. V kn.: Netraditsionnye prirodnye resursy, innovatsionnye tekhnologii i produkty]*. Moscow; 2016: 169–78. (in Russian)
14. Sekhon B.S. Metalloid compounds as drugs. *Res. Pharm. Sci.* 2013; 8(3): 145–58.
15. Cho J.M., Chae J., Jeong S.R., Moon M.J., Shin D.Y., Lee J.H. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind,

- placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. *PLoS One*. 2020; 19; 15(10): e0240358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240358>
16. 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 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' I]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
 17. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene*. 1938; 27: 493–7.
 18. 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. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
 19. 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* [Zuchenie protivovirusnoy aktivnosti zhidkikh sred dlya khraneniya rogovitsy v otnoshenii virusa prostogo gerpesa *in vitro*]. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(4): 228–36. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236> (in Russian)
 20. Yunkerov V.I., Grigor'ev S.G. *Mathematical and Statistical Processing of Medical Research Data [Matematiko-statisticheskaya obrabotka dannykh meditsinskikh issledovaniy]*. St. Petersburg: VMedA; 2002. (in Russian)
 21. 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. <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
 22. Kruppenbacher J.P., Klass R., Eggers H.J. A rapid and reliable assay for testing acyclovir sensitivity of clinical herpes simplex virus isolates independent of virus dose and reading time. *Antiviral Res.* 1994; 23(1): 11–22. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90029-9)
 23. Novoselova E.A., Alimbarova L.M., Monakhova N.S., Lepioshkin A.Yu., Ekins S., Makarov V.A. *In vivo* activity of pyrimidine-dispirotriperazinium in the male guinea pig model of genital herpes. *J. Virol. Antivir. Res.* 2020; 9(1). [https://doi.org/10.37532/jva.2020.9\(1\).193](https://doi.org/10.37532/jva.2020.9(1).193)
 24. Pshenichnikov V.A., Semenov B.F., Zezerov E.G. *Standardization of Methods of Virological Research [Standartizatsiya metodov virusologicheskikh issledovaniy]*. Moscow: Meditsina; 1974. (in Russian)
 25. Kern E.R., Richards J.T., Overall J.C., Glasgow L.A. Acyclovir treatment of experimental genital herpes simplex virus infections. I. Topical therapy of type 2 and type 1 infections of mice. *Antiviral Res.* 1983; 3(4): 253–67. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(83\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(83)90004-9)
 26. Kern E.R., Palmer J., Szczech G., Painter G., Hostetler K.Y. Efficacy of topical acyclovir monophosphate, acyclovir, or penciclovir in orofacial HSV-1 infections of mice and genital HSV-2 infections of guinea pigs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2000; 19(1-2): 501–13. <https://doi.org/10.1080/15257770008033024>
 27. Andronova V.L., Jasko M.V., Kukhanova M.K., Galegov G.A., Skoblov Y.S., Kochetkov S.N. Study of Antiherpetic Efficiency of Phosphite of Acycloguanosine Ableto Over come the Barrier of Resistance to Acyclovir. *Acta Naturae*. 2016; 8(1): 74–81.
 28. Rajpoot K. Acyclovir-loaded sorbitan esters-based organogel: development and rheological characterization. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017; 45(3): 551–9. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1161639>
 29. Rodrigues L.N.C., Zanluchi J.M., Grebogi I.H. Percutaneous absorption enhancers: Mechanisms and potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2007; 50(6): 949–61. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000700006>