

Гапанович В. Н., Бердина Е. Л., Андреев С. В., Филонюк В. А.¹, Павлов К. И.¹, Горбунов В. А.², Дронина А. М.², Красько А. Г.², Васильева Е. Н., Елисеенко А. Н., Мельник Д. К., Карпенко Е. А.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОВТОРНЫХ ВНУТРИМЫШЕЧНЫХ ВВЕДЕНИЙ (ХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ) ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЦЕЛЬНОВИРИОННОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19 НА ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПОКАЗАТЕЛИ РАЗЛИЧНЫХ ЗВЕНЬЕВ ГОМЕОСТАЗА НА ТЕСТ-МОДЕЛИ КРЫС ЛИНИИ SPRAGUE-DAWLEY. СООБЩЕНИЕ 1

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр ЛОТИОС»,
г. Минск, Республика Беларусь*

*¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

*²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь*

Аннотация. В ходе проведения доклинического исследования общетоксических свойств отечественной инактивированной цельновиральной вакцины БелКовидВак против коронавируса SARS-CoV-2 на крысах Sprague-Dawley изучено влияние многократного внутримышечного введения различных доз образцов ее первой опытно-промышленной серии на показатели, характеризующие общетоксическое действие препарата по воздействию на общее состояние, поведение и летальность животных, а также основные параметры гематологического, биохимического и гемостазиологического гомеостаза, макроскопическую картину, абсолютную и относительную массы важнейших органов жизнеобеспечения. Показано, что разработанный лекарственный препарат БелКовидВак при 4-кратном внутримышечном введении в дозах 0,1; 0,2; 0,3 и 0,8 мл/животное (в 1,6 раза превышает предполагаемую для вакцинации у человека) не вызывает летальных исходов и не проявляет общетоксического действия на все исследуемые в используемом дизайне показатели, в том числе и гендерных различий, не оказывает дозозависимых эффектов последствия, визуально оцениваемых изменений морфоструктуры основных органов жизнеобеспечения, их абсолютной массы и весовых коэффициентов, что указывает на отсутствие у исследуемого препарата способности потенцировать развитие токсико-фармакологического действия, свидетельствуя о потенциально высокой безопасности при клиническом применении.

Ключевые слова: вакцина, БелКовидВак, экспериментальные животные, крысы, повторное введение, доза, кратность, токсичность, безвредность, летальность, токсико-фармакологические эффекты, показатели общего состояния, гематологического, биохимического, гемостазиологического гомеостаза, абсолютная и относительная масса внутренних органов.

Введение. Молниеносное распространение нового возбудителя коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, которая признана пандемией, огромное количество заражений в более чем 200 странах, сложная прогнозируемость клинического течения и развития осложнений, отсутствие подходов к лечению обуславливают чрезвычайную актуальность проблемы разработки профилактических мероприятий, а именно — вакцины для медицинской профилактики COVID-19. Тем более, что летальность от возбудителя новой коронавирусной инфекции превосходит смертность от вируса гриппа в 30–40 раз. Медикаментозная терапия заболевания малоэффективна или неэффективна. Поэтому в период 2020–2023 гг., как отмечает Всемирная организация здравоохранения (далее — ВОЗ), в мире разработаны или разрабатываются около 180 различных вакцин против новой коронавирусной инфекции для обеспечения специфической профилактики заболевания, при этом ВОЗ рекомендует желательность подобной разработки в каждой развитой стране.

Приводимые в настоящем сообщении результаты являются частью комплексного доклинического исследования, впервые выполненного в Республике Беларусь с использованием образцов первой опытно-промышленной серии инактивированной цельновиральной вакцины БелКовидВак.

Разработка вакцины является поэтапным процессом, в том числе предусматривающим оценку данных о ее эффективности и безопасности в эксперименте на различных биотест-системах, включая доклинические исследования на лабораторных животных, прежде чем препарат будет испытан на ограниченном контингенте добровольцев в условиях клинического применения.

Существующая схема доклинических исследований (далее — ДКИ) разрабатываемой вакцины для человека, являясь новой для медицинской науки и фармацевтической промышленности нашей страны, основана на результатах длительных отечественных и зарубежных исследований лекарственных средств данной анатомо-терапевтической-химической классификации и предусматривает всестороннюю фармакологическую оценку ее токсичности и целевых свойств при различных режимах воздействия на организм лабораторных животных.

Результаты, приведенные в настоящем сообщении, получены с использованием основных положений международных руководств, рекомендуемых при проведении ДКИ иммунобиологических лекарственных препаратов того же типа, как и разработанный отечественный (инактивированная цельновирионная вакцина с адьювантом) [1–4].

Цель работы — изучить влияние повторных (4-кратных) внутримышечных введений (хроническая токсичность) образцов первой опытно-промышленной серии отечественной инактивированной цельновирионной вакцины для медицинской профилактики COVID-19 на общее состояние и показатели отдельных звеньев гомеостаза крыс Sprague-Dawley.

Материалы и методы. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [5], после получения разрешения комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными государственного предприятия «НПЦ ЛОТИОС» (протокол от 13.04.2023 № 15).

В работе использовали половозрелых SPF (specific pathogen free — свободные от патогенной флоры) крыс Sprague-Dawley (SD; источник — НПЦ «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г. Пушкино; Российская Федерация). Доказано, что крысы SD являются релевантными животными для исследований токсичности при многократном введении [6].

В соответствии с утвержденным протоколом исследований (далее — ПИ) были сформированы 4 опытные серии крыс (по 10 самцов и 10 самок в каждой) для введения разработанной вакцины БелКовидВак (первая опытно-промышленная серия — с. 010323; ОАО «БелВитунифарм», РУП «Белмедпрепараты»; Республика Беларусь), которым повторно 4-кратно — на 1, 15, 29 и 43-е сутки эксперимента внутримышечно вводили изучаемый препарат в дозах 0,1; 0,2; 0,3 и 0,8 мл/животное соответственно, что исходя из содержания общего вирусного белка в готовой лекарственной форме референтного препарата сравнения (10 мкг/0,5 мл) соответствует 2, 4, 6 и 16 мкг вирусного белка (в перерасчете на содержание в аликвотах референтного препарата) согласно рекомендациям регуляторного органа Министерства здравоохранения Республики Беларусь, а также контрольная серия животных (10 самок и 10 самцов), которым вводили натрия хлорид, раствор для инъекций изотонический 9 мг/мл в ампулах 5 мл (0,9% NaCl; с. 460522, ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»; Республика Беларусь) в максимальном объеме, принятом в дизайне ПИ. Исследование проведено отдельно для самок и самцов.

Продолжительность наблюдений составляла 56 суток (1–42-е сутки — вакцинальный период, 43–56-е сутки — поствакцинальный период). Экспериментальная программа включала:

- ежедневное наблюдение выживаемости крыс и клинический осмотр с оценкой: состояния волосяного покрова, двигательной активности, урикации, дефекации, возбудимости (угнетение/возбуждение), саливации, тремора/судорог, потребления корма и воды, нарушения дыхания и регистрации наличия признаков местнораздражающего действия — эритемы (в баллах) и отека (+/-), визуально [1, 7];

- взвешивание животных: до введения препарата и, далее, — 1 раз в неделю в течение периода исследования;

- по завершении периода наблюдений, на 57-е сутки эксперимента, после предварительной наркотизации (2% раствор натрия тиопентала, 40 мг/кг, в/в; с. 250921; ОАО «Синтез», Российская Федерация) — забор крови из аксиллярного сплетения для исследования гематологических, биохимических и гемостазиологических показателей крови;

- вскрытие павших животных (макроскопическое описание внутренних органов, в случае выраженных изменений — фотографирование) и всех выживших в конце эксперимента (определение относительной массы основных органов жизнеобеспечения, макроскопическое описание внутренних органов, в случае выраженных изменений — фотографирование).

Животные и их содержание. Самцы и самки крыс SD, возраст 4 месяца, содержались по 10 особей в поликарбонатных клетках с древесным наполнителем в качестве подстила, при температуре

окружающего воздуха 20–24 °С и относительной влажности 45–65 %; в помещениях их содержания поддерживался 12-часовой цикл освещения, получали корм в соответствии с рационом кормления для лабораторных грызунов и воду *ad libitum*. Рандомизация распределения по сериям/группам (самцы, самки) проводилась после карантинизации по массе тела таким образом, чтобы индивидуальное значение не отклонялось от показателя среднего значения в пределах одной группы более чем на 20 %. Каждому животному присваивался индивидуальный номер и наносилась соответствующая несмываемая метка на определенной части тела.

Процедура внутримышечного введения и оценка местнораздражающего действия. Внутримышечное введение препаратов (БелКовидВак, 0,9 % NaCl) осуществлялось 4-кратно (на 1, 15, 29 и 43-и сутки исследования) в предварительно выстриженный участок средней трети латеральной поверхности бедра крыс с соблюдением правил асептики и антисептики. Оценка эритемы проводили визуально (в баллах): отсутствие — 0; слабая (розовый тон) — 1; умеренно выраженная (розово-красный тон) — 2; выраженная (красный тон) — 3; резко выраженная (ярко-красный тон) — 4 [7]; оценку отека тканей проводили визуально: наличие отека — «+»; отсутствие отека — «-».

Определение массы тела, внутренних органов и их весовых коэффициентов. Определение массы тела крыс проводилось на весах WL2/C/A2/C/2 («Radwag», Польша), массы внутренних органов (головной мозг, тимус, подчелюстные лимфоузлы, сердце, легкие, печень, желудок, селезенка, почки, надпочечники) — на весах Scout SPX223 («OHAUS Corporation», США), парные органы взвешивались вместе. Масса тела животного непосредственно перед некропсией бралась для расчета весовых коэффициентов — как частное от деления массы исследуемого органа(ов) к массе животного, умноженное на 100 % [1].

Определение гематологических, биохимических и гемостазиологических показателей крови. Величину гематокрита, уровень гемоглобина, количество форменных элементов крови и ряд производных показателей исследовали с помощью анализатора крови «Sysmex XN-350» («Sysmex Corporation», Япония). Биохимические параметры сыворотки крови экспериментальных животных изучали с помощью автоматического биохимического анализатора «DIRUI CS-400/DIRUI» («Dirui Industrial Co., Ltd.», Китай), диагностические наборы этого же производителя. Плазменное звено системы гемостаза исследовано с учетом всех фаз свертывающего процесса: I фаза — активированное частичное тромбопластиновое время, с (далее — АЧТВ), II фаза — протромбиновое время, с (далее — ПВ), III фаза — тромбиновое время, с (далее — ТВ); измерение проводили на коагулометре СТ 2410 («SOLAR», Республика Беларусь) с использованием реагентов ОДО «Ренам» (Россия).

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ GraphPad Prism 7 (лицензия/серийный № GP7–1095667-RIOM-D4F5F). Различия определяли при уровне значимости $p < 0,05$ и отмечали значком *. Для данных применяли описательную статистику, рассчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего ($\pm m$). Для определения соответствия выборки нормальному распределению использовали критерий Шапиро — Уилка, а для определения достоверности различий с контрольной группой использовали критерий Даннета [1].

Результаты и их обсуждение. После 4-кратного внутримышечного введения разрабатываемой вакцины БелКовидВак в дозах 0,1; 0,2; 0,3 и 0,8 мл (на животное) гибель и признаки интоксикации у животных 1–4 опытных и контрольной серий не зарегистрированы.

Общее состояние и поведение крыс обоего пола опытных серий не отличались от животных контрольной. Животные всех экспериментальных серий на протяжении всего исследования были активны (в соответствии с биоритмикой крыс в течение суток), заинтересованно передвигались по клетке для содержания в различных направлениях, вставали на задние лапы, не проявляли агрессии друг к другу и к исследователям во время проведения манипуляций; их волосяной покров был гладким, блестящим, показатели груминга, равно как потребление корма и воды, — без отклонений. В отслеживаемый период у крыс не отмечено нарушений рефлекторной деятельности и болевой чувствительности, видимые слизистые оболочки были обычной окраски и без выделений, животные свободно принимали необходимую для осуществления жизнедеятельности позу, их дыхание соответствовало обстановке, каких-либо отклонений со стороны мышечной системы (тремор, судороги) не регистрировалось.

Полагаем необходимым отдельно отметить, что приведенные выше показатели общего состояния и поведения животных в перивакцинальном периоде не имели зависимости от кратности

вводимого препарата вакцины БелКовидВак, т. е. эффект последствия 1-го, 2-го, 3-го и 4-го введений был абсолютно идентичным и не имел гендерных различий при внутрисерийном сравнении. Отмеченный факт опосредованно указывает на отсутствие у разработанного отечественного препарата потенциальной способности проявлять самостоятельное токсико-фармакологическое действие в условиях его длительного повторного поступления в организм.

Визуальная оценка местных реакций в ответ на 4-кратное внутримышечное введение образцов опытно-промышленной серии разработанной вакцины в исследуемых нарастающих дозах также не выявила наличия у крыс — самцов и самок опытных серий отека (–) и эритемы (0 баллов) в месте введения, не наблюдались данные проявления локальной реакции тканей на инъекционное воздействие и у животных контрольной серии, получавших коммерческий 0,9% NaCl в объеме, эквивалентном максимально используемому в опытных сериях (0,8 мл; 4-я опытная серия).

В ходе экспериментального подтверждения/установления на этапе ДКИ токсико-фармакологических свойств новых лекарственных препаратов особое внимание придается оценке изменениям (тренд прироста: +/–) со стороны значений массы тела экспериментальных животных, которая является интегральным отражением последствия результирующего влияния в целом на организм событий, инициируемых изучаемым препаратом во взаимозависимых и взаимообусловленных системах поддержания гомеостаза (молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом, органном и системном), в силу чего позволяет уже на начальном этапе доклинического изучения получить общее представление о потенциально токсических свойствах тестируемого вещества. Результаты сравнительного изучения динамики изменений исследуемого показателя (при статистической обработке использовался критерий Даннета) в 56-дневном временном интервале наблюдений в ходе после повторного внутримышечного введения крысам обоих полов лекарственного препарата БелКовидВак в исследуемых дозировках показали отсутствие негативного влияния на массу тела и динамику ее прироста у крыс — самцов и самок всех опытных серий по сравнению с животными контрольной серии: вне зависимости от используемой дозы прирост массы тела был положительным, и его абсолютные значения на протяжении всего периода наблюдений в 1–4 опытных сериях статистически значимо не отличались от такового у крыс с введением 0,9% NaCl.

Особый интерес представляло изучение влияния отечественной вакцины БелКовидВак на показатели периферической крови, изменение которых хронологически проявляется в более ранние сроки после воздействия на организм того или иного токсического агента, в силу чего могут служить источником дополнительной информации возможного негативного влияния исследуемого препарата на процессы костномозгового кроветворения, в нашем случае — в ответ на введение в организм иммуномодулирующего ксенобиотика. Средние значения цитогематологических показателей периферической крови крыс по сериям эксперимента представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 — Гематологические показатели крови крыс-самцов при повторном внутримышечном введении инактивированной цельновирионной вакцины БелКовидВак

Исследуемый показатель	Экспериментальная серия, доза (мл/крысу)				
	контрольная, (NaCl, 0,8 мл)	1 опытная, (0,1 мл)	2 опытная, (0,2 мл)	3 опытная, (0,3 мл)	4 опытная, (0,8 мл)
Эритроциты, $10^{12}/л$	9,25 ± 0,10	9,08 ± 0,08	9,02 ± 0,16	9,46 ± 0,14	9,06 ± 0,11
Гемоглобин, г/л	160,40 ± 1,44	159,40 ± 1,08	157,40 ± 3,14	163,80 ± 2,08	156,60 ± 1,69
Гематокрит, %	50,24 ± 0,31	52,34 ± 1,83	49,32 ± 1,07	51,36 ± 0,57	48,88 ± 0,72
MCV, фл	54,34 ± 0,82	55,44 ± 0,39	54,66 ± 0,63	54,30 ± 0,34	53,98 ± 0,67
MCH, пг	17,34 ± 0,31	17,58 ± 0,18	17,44 ± 0,19	17,32 ± 0,17	17,30 ± 0,20
Тромбоциты, $10^9/л$	717,00 ± 25,24	734,20 ± 46,10	742,00 ± 49,56	665,20 ± 17,38	707,20 ± 33,19
MPV, фл	7,84 ± 0,12	7,62 ± 0,10	7,38 ± 0,15*	7,20 ± 0,14*	7,56 ± 0,07
Лейкоциты, $10^9/л$	9,88 ± 0,59	8,39 ± 0,70	10,52 ± 0,88	10,22 ± 1,22	8,69 ± 0,58
Лимфоциты, %	86,24 ± 1,11	86,08 ± 0,85	84,40 ± 1,06	83,92 ± 0,90	83,72 ± 0,97
Моноциты, %	2,56 ± 1,00	0,80 ± 0,09	2,94 ± 1,15	4,32 ± 0,87	3,24 ± 1,17

Исследуемый показатель	Экспериментальная серия, доза (мл/крысу)				
	контрольная, (NaCl, 0,8 мл)	1 опытная, (0,1 мл)	2 опытная, (0,2 мл)	3 опытная, (0,3 мл)	4 опытная, (0,8 мл)
Нейтрофилы, %	8,32 ± 0,70	8,86 ± 0,61	8,88 ± 0,89	8,22 ± 0,31	8,90 ± 0,44
Эозинофилы, %	0,82 ± 0,05	1,42 ± 0,33	0,98 ± 0,07	1,14 ± 0,10	1,36 ± 0,12
Базофилы, %	2,06 ± 0,09	2,84 ± 0,43	2,80 ± 0,30	2,40 ± 0,26	2,78 ± 0,45
Ретикулоциты, %	2,67 ± 0,16	2,71 ± 0,12	2,79 ± 0,14	2,57 ± 0,20	2,82 ± 0,08

* достоверность различий по сравнению со значениями у животных контрольной серии по критерию Dunnett's при $p < 0,05$.

Примечания:
1) MCV — средний объем эритроцитов в крови;
2) MCH — среднее содержание гемоглобина в эритроцитах;
3) MPV — средний объем тромбоцита.

Таблица 2 — Гематологические показатели крови крыс-самок при повторном внутримышечном введении инактивированной цельновирионной вакцины БелКовидВак

Исследуемый показатель	Экспериментальная серия, доза (мл/крысу)				
	контрольная, (NaCl, 0,8 мл)	1 опытная, (0,1 мл)	2 опытная, (0,2 мл)	3 опытная, (0,3 мл)	4 опытная, (0,8 мл)
Эритроциты, $10^{12}/л$	7,90 ± 0,12	7,84 ± 0,20	8,11 ± 0,13	8,31 ± 0,12	7,93 ± 0,09
Гемоглобин, г/л	143,80 ± 0,66	145,40 ± 1,03	147,60 ± 2,56	148,80 ± 1,63	148,60 ± 1,47
Гематокрит, %	44,28 ± 0,23	44,44 ± 0,35	45,44 ± 0,85	45,72 ± 0,50	45,20 ± 0,62
MCV, фл	56,12 ± 1,10	56,80 ± 1,05	56,04 ± 0,68	55,06 ± 1,00	57,02 ± 0,46
MCH, пг	18,20 ± 0,34	18,58 ± 0,40	18,18 ± 0,21	17,92 ± 0,30	18,76 ± 0,14
Тромбоциты, $10^9/л$	607,80 ± 33,11	722,00 ± 36,01	607,20 ± 34,99	587,20 ± 50,55	633,80 ± 66,40
MPV, фл	7,68 ± 0,07	7,74 ± 0,09	7,46 ± 0,04	7,36 ± 0,06*	7,66 ± 0,07
Лейкоциты, $10^9/л$	6,27 ± 0,73	4,88 ± 0,53	5,00 ± 0,68	6,01 ± 0,70	5,39 ± 0,50
Лимфоциты, %	86,60 ± 1,58	88,04 ± 2,11	85,76 ± 1,20	79,90 ± 1,82*	86,62 ± 1,57
Моноциты, %	1,20 ± 0,05	1,04 ± 0,13	1,86 ± 0,14	2,28 ± 0,99	1,20 ± 0,19
Нейтрофилы, %	8,52 ± 1,15	7,34 ± 1,70	8,08 ± 0,83	11,98 ± 1,17	7,92 ± 1,38
Эозинофилы, %	1,58 ± 0,54	1,82 ± 0,29	2,36 ± 0,37	3,12 ± 0,92	2,68 ± 0,55
Базофилы, %	2,10 ± 0,38	1,76 ± 0,27	1,94 ± 0,38	2,72 ± 0,51	1,58 ± 0,27
Ретикулоциты, %	3,04 ± 0,22	3,44 ± 0,37	2,77 ± 0,19	2,87 ± 0,26	3,15 ± 0,21

* достоверность различий по сравнению со значениями у животных контрольной серии по критерию Dunnett's при $p < 0,05$.

Примечания:
1) MCV — средний объем эритроцитов в крови;
2) MCH — среднее содержание гемоглобина в эритроцитах;
3) MPV — средний объем тромбоцита.

Полученные результаты указывают на то, что 4-кратное с интервалом 14 суток введение БелКовидВак в исследуемых дозах не оказывало негативного влияния на регистрируемые у крыс-самцов и крыс-самок всех опытных серий показатели «красной» крови, включая количество незрелых форм эритроцитов, а также тромбоцитов, лейкоцитов и их популяционный состав, которые на 57-е сутки эксперимента находились в пределах соответствующих значений у животных контрольной серии. В свою очередь, у крыс-самцов 2 и 3 опытных серий через 1 сутки после окончания наблюдений регистрировали снижение ($p < 0,05$) среднего объема тромбоцитов — на 5,87 и 8,16% соответственно относительно животных контрольной серии. У крыс-самок 3 опытной серии в данный временной интервал отмечено снижение ($p < 0,05$) среднего объема тромбоцитов — на 4,17% и содержания лимфоцитов — на 7,74% относительно таковых у животных контрольной серии. Отмеченные сдвиги приведенных показателей не превышали 10%, не имели дозозависимого эффекта, поскольку не регистрировались у животных ни 1 опытной серии, получавших повторные инъекции разрабатываемой вакцины в минимальной из исследованных доз (0,1 мл), ни у крыс 4 опытной серии, получавших препарат в дозе, в 1,6 раза превышающей

предполагаемую для практического применения (0,8 мл). Количественные значения других исследуемых показателей (содержание тромбоцитов, ретикулоцитов, лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и эозинофилов) крови крыс обоего пола всех опытных серий на 57-е сутки эксперимента достоверно не отличались от зарегистрированных у животных контрольной серии.

Исследование показателей плазменного (вторичного) гемостаза крови у животных обоего пола, получавших разработанный лекарственный препарат БелКовидВак, не выявило статистически значимых изменений по всем изученным показателям АЧТВ, ПВ, ТВ и фибриноген, что свидетельствовало об отсутствии у образцов первой опытно-промышленной серии отечественной вакцины способности проявлять в исследуемом диапазоне доз отрицательные токсико-фармакологические эффекты на показатели факторного гемостаза.

Изучение изменений биохимических показателей плазмы/сыворотки крови в ответ на то или иное воздействие на организм является важным элементом ДКИ разрабатываемого лекарственного препарата, поскольку выявление отклонений параметров биохимического гомеостаза от своих референтных значений также является свидетельством наиболее ранних проявлений токсических свойств исследуемых веществ, позволяя выявить их потенциально нежелательное воздействие на органы- и ткани-мишени еще задолго до регистрации развития морфофункциональных расстройств.

Анализ биохимических показателей (активность трансаминаз, содержание общего белка, альбумина, мочевины, креатинина, глюкозы, холестерина, общего билирубина, железа, С-реактивного белка) сыворотки крови показал, что у крыс-самцов 1 и 2 опытных серий по окончании поствакцинального периода не выявлялось статистически достоверных различий значений регистрируемых параметров относительно таковых у крыс контрольной серии. Вместе с тем у крыс-самцов 3 опытной серии отмечено увеличение концентрации общего белка на 6,04 % ($p < 0,05$) и альбумина на 4,30 % ($p < 0,05$), крыс-самцов 4 опытной серии — снижение ($p < 0,05$) активности аланинаминотрансферазы на 8,08 %. У крыс-самок через 2 недели после окончания курса 4-кратных внутримышечных введений БелКовидВак отклонений по большинству регистрируемых биохимических показателей при их сравнении со значениями у животных контрольной серии не выявлено. Исключение составили лишь более низкие ($p < 0,05$) значения концентрации общего билирубина в крови самок 1, 2 и 4 опытных серий — на 35,2, 33,3 и 38,9 % соответственно.

Необходимо отметить, что приведенные выше отклонения отдельных показателей находились в границах своих референтных значений, принимаемых за условную норму. Данное обстоятельство также указывает на полное отсутствие какого-либо дозозависимого эффекта в условиях проведенного эксперимента.

Статистический анализ относительной массы основных органов жизнеобеспечения (тимуса, сердца, легких, селезенки, печени, почек, надпочечников, желудка, головного мозга и подчелюстных лимфоузлов) крыс-самцов и крыс-самок всех опытных серий не выявил достоверных отличий значений данных показателей при сравнении с животными контрольной серии, что свидетельствует об отсутствии системного органотропного токсико-фармакологического действия вакцины БелКовидВак на основные органы жизнеобеспечения организма крыс, включая иммунотропные органы-мишени (тимус, легкие и селезенка).

По результатам макроскопического (визуального) исследования изучаемых органов жизнеобеспечения, проведенного после эвтаназии животных, существенных различий между всеми сериями эксперимента (равно как и при внутрисерийном сравнении между самками и самцами) не установлено. Во время вскрытия в грудной и брюшной полостях крыс постороннего содержимого не обнаружено; органы в полостях располагались анатомически правильно, без видимых патоморфологических изменений; париетальный и висцеральный листки плевры и брюшины были полупрозрачные, влажные, блестящие, гладкие, серого цвета. Статистический анализ относительной массы головного мозга, тимуса, подчелюстных лимфоузлов, сердца, легких, печени, желудка, селезенки, почек и надпочечников крыс-самцов и крыс-самок всех опытных серий не выявил достоверных отличий значений данных показателей при сравнении с животными контрольной серии, что свидетельствовало об отсутствии способности вакцины БелКовидВак оказывать системное органотропное токсико-фармакологическое действие, включая иммунокомпетентные органы-мишени (тимус, легкие и селезенка), указывая на потенциальную токсикологическую безопасность разработанного отечественного препарата при его последующем клиническом применении.

Заключение. В ходе проведения доклинического изучения общетоксических свойств отечественной инактивированной цельновирионной вакцины БелКовидВак против коронавируса SARS-CoV-2 на крысах Sprague-Dawley в хроническом эксперименте изучено влияние повторного 4-кратного внутримышечного введения различных доз образцов ее первой опытно-промышленной серии (с. 010323; ОАО «БелВитунифарм», РУП «Белмедпрепараты»; Республика Беларусь) на показатели, характеризующие общетоксическое действие препарата на общее состояние, поведение, массу тела и ее прирост, летальность животных; основные параметры гематологического, биохимического и гемостазиологического гомеостаза, а также макроскопическую картину, абсолютную и относительную массы важнейших органов жизнеобеспечения. Показано, что БелКовидВак при многократном введении в дозах 0,1; 0,2; 0,3 и 0,8 мл (в 1,6 раза превышает предполагаемую для вакцинации у человека) на 1 животное не вызывает летальных исходов и не проявляет общетоксического действия на все исследуемые в используемом дизайне показатели, в том числе и гендерных различий, не вызывает дозозависимых эффектов последствия, визуально оцениваемых изменений морфоструктуры основных органов жизнеобеспечения, их абсолютной массы и весовых коэффициентов, что указывает на отсутствие у разработанного отечественного препарата способности к развитию токсико-фармакологического эффекта, свидетельствуя о потенциально высокой безопасности при клиническом применении.

Сведения о НИР (наименование, регистрационный номер). Исследование проведено в рамках НИОК(Т)Р «Провести доклинические исследования инактивированной цельновирионной вакцины для медицинской профилактики COVID-19» (Пер. № НИОКТР 20221840).

Литература

1. Руководство по доклиническому изучению лекарственных средств / под общ. ред. А. Н. Миронова. — М. : Гриф и К, 2012. — 944 с.
2. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines / World Health Organization. — Geneva : WHO, 2005. — 36 p. — (WHO technical report series; № 927).
3. Guidance for Industry. Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications [Electronic resource] / Center for Biologics Evaluation and Research. — 2006. — Mode of access: <https://www.fda.gov/media/73986/download>. — Date of access: 22.08.2023.
4. Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19. Guidance for Industry [Electronic resource] / Center for Biologics Evaluation and Research. — 2020. — Mode of access: <https://www.fda.gov/media/139638/download>. — Date of access: 22.08.2023.
5. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях / Совет Европы. — Страсбург, 1986. — 13 с.
6. Repeat-dose toxicity of candidate Omicron COVID-19 vaccine in Sprague-Dawley rats / Y. Zhao [et al.] // COVID. — 2023. — Vol. 3. — P. 51–64.
7. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: инструкция 1.1.11-12-35-2004 : утв. постановлением Гл. гос. санитар. врача Респ. Беларусь 14.12.2004 № 131 // Сб. норматив. документов / РЦГЭиОЗ. — Минск, 2004. — 43 с.

*Gapanovich V.N., Berdina E.L., Andreyev S.V., Filonyuk V.A.¹, Pavlov K.I.¹,
Gorbunov V.A.², Dronina A.M.², Krasko A.G.², Vasilyeva E.N.,
Eliseenko A.N., Melnik D.K., Karpenko E.A.*

**STUDY OF THE EFFECT OF REPEATED INTRAMUSCULAR INJECTIONS
(CHRONIC TOXICITY) OF DOMESTIC INACTIVATED WHOLE-VIRION VACCINE FOR
MEDICAL PREVENTION OF COVID-19 ON THE GENERAL
CONDITION AND INDICATORS OF VARIOUS LINKS OF HOMEOSTASIS
ON A TEST MODEL OF SPRAGUE-DAWLEY RATS. MESSAGE 1.**

Republican Unitary Enterprise «Scientific and Practical Center LOTIOS», Minsk, Belarus

¹Educational institution «Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus

*²State institution «Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology»,
Minsk, Belarus*

During the preclinical study of the general toxic properties of the domestic inactivated whole-virion vaccine BelCovidVak against coronavirus SARS-CoV-2 on Sprague-Dawley rats, the effect of repeated intramuscular administration of various doses of samples of its first pilot series on the indicators characterizing the general toxic effect of the drug on the general condition, behavior and mortality of animals, as well as the main parameters was studied hematological, biochemical and hemostasiological homeostasis, macroscopic picture, absolute and relative mass of the most important life support organs. It has been shown that the developed drug BelCovidVak with 4-fold intramuscular administration in doses of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.8 ml/animal (1.6 times higher than the intended for vaccination in humans) does not cause deaths and does not show a general toxic effect on all the studied in the design used indicators, including gender differences, do not cause dose-dependent aftereffects, visually assessed changes in the morphostructure of the main life support organs, their absolute mass and weight coefficients, this indicates that the studied drug does not have the ability to potentiate the development of a toxic-pharmacological effect, indicating potential high safety in clinical use.

Keywords: vaccine, protein supplement, experimental animals, rats, repeated administration, dose, multiplicity, toxicity, harmlessness, lethality, toxic and pharmacological effects, indicators of general condition, hematological, biochemical, hemostasiological homeostasis, absolute and relative mass of internal organs.

References.

1. Mironov A.N., chief ed. Guidelines for Preclinical Drug Study. Moscow: Grif i K; 2012: 944 p. (in Russian)
2. WHO (2005). WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO technical report series; № 927.
3. Center for Biologics Evaluation and Research (2006). Guidance for Industry. Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications. Available at: <https://www.fda.gov/media/73986/download> (accessed 22 August 2023).
4. Center for Biologics Evaluation and Research (2006). Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19. Guidance for Industry. Available at: <https://www.fda.gov/media/139638/download> (accessed 22 August 2023).
5. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experiments or for other scientific purposes. Strasbourg; 1986. 13 p.
6. Zhao Y., He Z., Wang Z. et al. Repeat-dose toxicity of candidate Omicron COVID-19 vaccine in Sprague-Dawley rats. COVID. 2023; 3: 51–64.
7. Requirements for conducting experimental studies for primary toxicological assessment and hygienic regulation of substances: instruction 1.1.11–12–35–2004. In: Collection of normative documents. Minsk; 2004: 43 p. (in Russian)

e-mail для переписки: lotios@yandex.ru

Поступила 31.10.2023

ISSN 2076-3778

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
РЕСПУБЛИКАНСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ»

ЗДОРОВЬЕ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА
Сборник научных трудов

Выпуск 33

Минск
Издательский центр БГУ
2023