

Изучение противовирусной активности и фармакологической безопасности интраназальной формы двуспиральной рибонуклеиновой кислоты

*С. Г. ГАМАЛЕЙ, Г. Г. ШИМИНА, Е. С. ЦЫПЛЕНКОВА, О. В. СИМАКОВА, М. О. СКАРНОВИЧ, М. А. СКАРНОВИЧ, Л. Н. ШИШКИНА, О. С. ТАРАНОВ, О. С. ИВАНОВА, Г. М. ЛЕВАГИНА, Е. Д. ДАНИЛЕНКО

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Кольцово, Новосибирская область, Россия

Study on Antiviral Activity and Pharmacological Safety of Double-Stranded Ribonucleic Acid for Intranasal Administration

*SVETLANA G. GAMALEY, GALINA G. SHIMINA, ELENA S. TSYPLENKOVA, OLGA V. SIMAKOVA, MAXIM O. SKARNOVICH, MARIA A. SKARNOVICH, LARISA N. SHISHKINA, OLEG S. TARANOV, OLGA S. IVANOVA, GALINA M. LEVAGINA, ELENA D. DANILENKO

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Резюме

Препараты индукторов интерферона представляют интерес как препараты первой линии защиты при вирусных инфекциях, в том числе гриппе. В Институте медицинской биотехнологии — филиале ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана интраназальная форма препарата двуспиральной РНК (дсРНК), выбраны вспомогательные вещества и рецептура препарата. В данной работе представлены результаты изучения противовирусной активности и фармакологической безопасности новой лекарственной формы дсРНК. Исследование противовирусной активности препарата проведено на мышах BALB/c, инфицированных вирусами гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) или Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09), изучение безопасности — при однократном введении белым аутбредным мышам ICR. Исследование показало, что интраназальная форма дсРНК в дозе 2,5 мг/кг при лечебно-профилактической схеме применения повышает выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, инфицированных указанными штаммами вируса гриппа. Защитный эффект препарата на мышах, заражённых летальной дозой вируса Bishkek/01/2009, был сравним с эффектом препарата Тамифлю. Отсутствие токсического воздействия интраназальной формы дсРНК в фармакологической дозе на организм лабораторных мышей, состояние физиологических систем организма и основные виды обмена, установленное экспериментально, позволило сделать вывод о фармакологической безопасности и перспективности дальнейших работ по завершению фармацевтической разработки нового противовирусного лекарственного средства.

Ключевые слова: двуспиральная РНК; дсРНК; интраназальная форма; противовирусная активность; фармакологическая безопасность; вирус гриппа; мыши

Для цитирования: Гамалей С. Г., Шими́на Г. Г., Цыпле́нкова Е. С., Симакова О. В., Скарнович М. О., Скарнович М. А., Шишки́на Л. Н., Тара́нов О. С., Лева́гина Г. М., Даниле́нко Е. Д. Изучение противовирусной активности и фармакологической безопасности интраназальной формы двуспиральной рибонуклеиновой кислоты. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 42–48. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>.

Abstract

Interferon inducers are of interest as the first line of defense against viral infections, including influenza. Double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for intranasal administration has been developed, the excipients and drug components were selected at the Institute of Medical Biotechnology, a branch of the State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector». This work presents the results of the study on antiviral activity and pharmacological safety of a new form of dsRNA. The antiviral activity of the preparation was studied in BALB/c mice infected with influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) or Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09) viruses. A safety study was performed with a single administration of intranasal dsRNA into white outbred ICR mice. The study showed that the administration of therapeutic and prophylactic regimen of intranasal dsRNA at a dose of 2.5 mg/kg increases the survival and average life expectancy of mice infected with the mentioned strains.

of influenza virus. The protective effect of the preparation in mice infected with a lethal dose of Bishkek/01/2009 virus was comparable to the effect of Tamiflu. The absence of toxic effects of intranasal dsRNA at a pharmacological dose in laboratory mice, the functional state of their physiological systems, as well as main types of metabolism, established in the experiments, lead to a conclusion concerning pharmacological safety of the preparation and the prospects for further work to complete pharmaceutical development of a new antiviral drug.

Keywords: double-stranded RNA; intranasal dsRNA; antiviral activity; pharmacological safety; influenza virus; mice

For citation: Gamaley S. G., Shimina G. G., Tsyplenkova E. S., Simakova O. V., Skarnovich M. O., Skarnovich M. A., Shishkina L. N., Taranov O. S., Ivanova O. S., Levagina G. M., Danilenko E. D. Study on antiviral activity and pharmacological safety of double-stranded ribonucleic acid for intranasal administration. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 42–48. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>.

Введение

Эволюция вирусов гриппа, приводящая к появлению новых вирусных вариантов, высокий эпидемический потенциал гриппозной инфекции позволяют говорить о том, что поиск новых противовирусных препаратов по-прежнему не теряет своей актуальности. Учитывая значительную продолжительность разработки средств специфической профилактики и лечения, особый интерес в качестве лечебно-профилактических средств при возникновении новых вирусных вариантов представляют неспецифические средства противовирусной защиты, к которым относятся, в частности, индукторы интерферона. Двухспиральные РНК (дсРНК) принадлежат к особому классу индукторов, обладающих широчайшим спектром биологического действия. Первичный каскад ответных реакций организма на вирусное заражение и введение экзогенной дсРНК (узнавание, инициация внутриклеточных сигнальных путей) имеет много общего, что позволяет рассматривать эти соединения как естественные регуляторы противовирусных реакций [1]. В настоящее время на основе дсРНК разработан и зарегистрирован ряд препаратов преимущественно инъекционного применения (Амплиген, Ридостин, Полудан, Ларифан).

Учитывая, что «входными воротами» гриппозной инфекции являются слизистые, весьма привлекательный способ доставки активного вещества заключается в его трансмукозальном введении, в частности, интраназальном. Возможность локального воздействия активного вещества позволяет не только снизить величину эффективной дозы, но и как следствие — уменьшить возможные побочные эффекты препарата.

Ранее в Институте медицинской биотехнологии — филиале ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была разработана рецептура новой лекарственной формы дсРНК для интраназального применения, подобраны вспомогательные вещества, обеспечивающие стабильность её противовирусных свойств [2].

Цель исследования — изучение противовирусной активности новой интраназальной формы дсРНК на двух моделях гриппозной инфекции и оценка фармакологической безопасности препарата.

Материал и методы

Препараты. В экспериментах использовали препараты интраназальной формы дсРНК с содержанием субстанции дсРНК в двух дозировках: 1 мг/дозу (образец 1) и 0,5 мг/дозу (образец 2). Активный компонент препарата — субстанция дсРНК (Натриевая соль двухспиральной рибонуклеиновой кислоты, ФСП РН № 002021/01-07 04 20090769-08) представляла собой смесь дрожжевых одноцепочечных и двухспиральных РНК с содержанием дсРНК 20%. Состав интраназальной формы: субстанция дсРНК — 1 мг, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) — 0,05 мг, диметилсульфоксид — 0,05 мг, полиэтиленгликоль (ПЭГ-400) — 0,05 мг, натрия хлорид — 0,002 мг.

Препаратами сравнения служили:

— субстанция препарата Ридостин производства ООО «Диафарм» (г. Бердск Новосибирской области) с содержанием дсРНК 13,6%;

— противовирусный препарат, ингибитор нейраминидазы Тамифлю (Ля Рош Лтд., Швейцария);

— натрия хлорид буфус, растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций 0,9 % ЛПИ-005762/08 (далее — физиологический раствор);

— буфер для приготовления интраназальной формы препарата. Состав 1 флакона: ЭДТА — 0,05 мг, диметилсульфоксид — 0,05 мг, ПЭГ-400 — 0,05 мг, натрия хлорид 0,9% до 1 мл.

Вирусные модели. Для воспроизведения вирусной модели были использованы штаммы вируса гриппа (ВГ) A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Экспериментальные животные. Исследование противовирусной активности препаратов проведено на 120 мышах обоего пола линии Balb/c возрастом 5 нед. с массой тела 15–18 г. Для изучения фармакологической безопасности использовали 60 белых аутбредных мышей ICR (CD-1), 30 самцов и 30 самок возрастом 7–8 нед. с массой тела 19–21 г. Животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р. п. Кольцово Новосибирской обл.).

Содержание мышей и эксперименты на них осуществляли в соответствии с российскими и международными требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [3–5].

Метод изучения противовирусной активности. Для оценки противовирусной активности препаратов было проведено две серии экспериментов. Животные в обеих сериях были распределены между экспериментальными группами случайным образом, по 10 особей в группе. В первом эксперименте мышам всех групп интраназально вводили ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2), во втором — ВГ A/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09) в дозе 10 ЛД₅₀ в объёме 40 мкл суммарно в обе ноздри. Животным первой опытной группы вводили интраназальную форму дсРНК (образец 1) в дозе 2,5 мг/кг в объёме 25 мкл на мышь, второй опытной группы — интраназальную форму дсРНК (образец 2) в дозе 1,25 мг/кг в объёме 25 мкл на мышь. Животные третьей и четвертой групп (группы сравнения) получали интраназально раствор препарата Ридостин (субстанция) в эквивалентном объёме. Доза препарата для 3-й группы составляла 2,5 мг/кг, для 4-й —

1,25 мг/кг. Препараты дсРНК вводили за 3 ч до заражения ВГ, через 1 и 3 сут после заражения. Животным пятой группы (положительный контроль) перорально вводили противовирусный препарат Тамифлю (Ля Рош Лтд., Швейцария) в дозе 25 мг/кг через 1 ч после заражения ВГ, далее дважды в сутки в течение 4 сут после заражения (всего 10 раз в течение 5 сут). Животные, инфицированные ВГ и не получавшие препаратов, составляли группу отрицательного контроля (группа 6).

В ходе оценки противовирусной активности препаратов регистрировали гибель животных в течение 16 сут наблюдения после заражения ВГ, рассчитывали коэффициент защиты (КЗ) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей. За максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 сут после заражения ВГ, то есть гарантированное время прекращения гибели инфицированных мышей.

Метод изучения фармакологической безопасности.

Для изучения фармакологической безопасности интраназальной лекарственной формы дсРНК животные были разделены на 3 группы — 1 опытную и 2 контрольные, по 10 особей каждого пола в группе. Мышам опытной группы однократно интраназально в оба носовых хода вводили раствор препарата интраназальной формы дсРНК (образец 1) в дозе 2,5 мг/кг в объёме 10 мкл на 20 г массы тела. Животные первой контрольной группы получали физиологический раствор, второй — буфер для приготовления интраназальной формы в тех же объёмах, что и опытная группа.

В течение первых суток и один раз в день в течение 7 сут после введения оценивали внешний вид, состояние шерстного покрова, глаз, ушей, конечностей, зубов, проводили клинический осмотр животных для оценки возможных отклонений состояния здоровья.

До введения препарата, через 5 ч, 1 сут и 7 сут измеряли массу (электронные весы SCOUT II SC 4010, OHAUS, США) и температуру тела (термометр ТПЭМ-1, Россия) мышей. Через 5 и 24 ч после введения у 10 самцов и 10 самок на каждый срок забирали кровь на гематологический и биохимический анализ. В образцах крови с помощью автоматического гематологического анализатора MicroCC-20 Plus VET (США) определяли число лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит. Расчёт лейкограммы проводили стандартным методом с использованием светового микроскопа [6]. Биохимический анализ включал определение в сыворотке крови маркерных показателей, отражающих состояние основных видов обмена и интегральных систем организма. Определение уровня показателей проводили на биохимическом анализаторе Miura 200 (I.S.E. S.r.l., Италия) с помощью коммерческих наборов (АО «Вектор-Бест», Кольцово, Новосибирская обл.).

После взятия крови и эвтаназии мышей путём мгновенной дислокации шейных позвонков проводили некропсию животных, исследование и взвешивание внутренних органов (электронные аналитические весы GX-200 (AND, Япония) с последующим вычислением их весовых индексов (масса органа в мг, деленная на массу животного в г, умноженная на 10). В ходе патоморфологического исследования оценивали макроскопическое состояние грудной, брюшной и тазовой полости с находящимися в них органами и тканями. Особое внимание было уделено месту введения препаратов — области наружного носа и носовых отверстий. Визуально оценивали такие параметры как размер, форма, цвет, наличие или отсутствие выделений.

Для гистологического исследования забирали образцы внутренних органов от 5 животных обоего пола каждой опытной и контрольной группы. Органы и ткани фиксировали, обезвоживали и пропитывали парафином по общепринятой методике. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали световой микроскопией.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку и сравнение данных, полученных при изучении

противовирусной активности препаратов, осуществляли с помощью пакета компьютерных программ анализа данных «Statistica 7.0». Для проверки статистических гипотез о виде распределения показателей применяли критерий Колмогорова–Смирнова при вероятности ошибки $p > 0,10$. СПЖ представлены в виде $M \pm Sm$, где M — среднее арифметическое значение и Sm — стандартное отклонение. Сравнение СПЖ мышей в разных группах проводили с использованием U -критерия Манна–Уитни. Различия показателей выживаемости животных оценивались с помощью критерия χ^2 с учётом поправки Йетса для малых выборок. Отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Данные исследования фармакологической безопасности обрабатывали с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., США). При статистической обработке результатов термометрии и массы тела оценку нормальности распределения проводили по критерию Шапиро–Вилка. Группы с нормальным распределением сравнивали параметрическими тестами — ANOVA и t -критерием Стьюдента. При сравнении групп с распределением, отличным от нормального, а также групп с пятью переменными (гематологические данные и весовые индексы) для оценки межгрупповых различий применяли непараметрический H -критерий Краскела–Уоллиса и U -критерий Манна–Уитни. Критический уровень статистической значимости (p) для множественных сравнений принимали равным 0,05. При обнаружении статистически значимых различий проводили апостериорные сравнения с помощью двухвыборочных критериев (Стьюдента и Манна–Уитни), при этом скорректированный критический уровень значимости (p) для трёх попарных сравнений принимали равным 0,0170 (при $p = 95\%$). Экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения противовирусной активности. Введение препарата Тамифлю в течение 5 сут после заражения летальной дозой вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) защищало от гибели 90% инфицированных мышей (табл. 1). Средняя продолжительность жизни мышей этой группы значительно превышала показатели контрольных животных (более чем на 9 дней). Эти данные подтверждают адекватность использованной вирусной модели и её чувствительность к противовирусным препаратам.

Введение интраназальной формы дсРНК и препарата сравнения Ридостин (субстанция) в дозе 2,5 мг/кг по лечебно-профилактической схеме (за 3 ч до заражения, через 1 и 3 сут после заражения) обеспечивало защиту, соответственно, 50 и 40% инфицированных мышей при 100% гибели контрольных животных (см. табл. 1). Средняя продолжительность жизни мышей этих групп статистически значимо (в 1,8–1,9 раз) превышала показатель контрольных животных.

Снижение дозы исследованных препаратов дсРНК в два раза приводило к исчезновению защитного эффекта (см. табл. 1).

Аналогичные закономерности наблюдались и на другой модели экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной пандемическим штаммом ВГ A/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09). Введение интраназальной формы дсРНК, также как суб-

Таблица 1. Противовирусная активность интраназальной формы дсРНК в экспериментах на мышах линии BALB/c, инфицированных ВГ А/Aichi/2/68 (H3N2)**Table 1. Antiviral activity of intranasal dsRNA in BALB/c mice infected with influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus**

Группа (n=10)	Препарат, доза	Число (%) погибших мышей	Коэффициент защиты (КЗ), %	СПЖ, сут (M±Sm)
1	Интраназальная форма дсРНК (образец 1), 2,5 мг/кг	5 [#] (50)	50	11,20±5,07*
2	Интраназальная форма дсРНК (образец 2), 1,25 мг/кг	9 (90)	10	7,90±3,25
3	Ридостин (субстанция), 2,5 мг/кг	6 [#] (60)	40	10,70±4,79*
4	Ридостин (субстанция), 1,25 мг/кг	9 (90)	10	7,90±3,00
5	Тамифлю, 25 мг/кг	1 [#] (10)	90	15,10±2,85*
6	Контроль	10 (100)	—	5,9±0,88

Примечание. Здесь и в табл. 2: коэффициент защиты (КЗ) определяли по формуле: КЗ = % гибели в контроле – % гибели в опыте; СПЖ рассчитывали на 16-е сутки. M — среднее; Sm — стандартное отклонение; n — число животных в группе, n=10. [#] — отличие от Контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; * — отличие от Контроля по U-критерию Манна–Уитни при $p \leq 0,05$.

Note. Here and Table 2: the protection coefficient (PC) was determined by the formula: PC = % of death in the control group — % of death in the study group; Average life expectancy (ALE) was calculated on the 16th day post infection. M — mean; Sm — standard deviation; n — number of animals in the group, n=10. [#] — difference from Control according to the criterion χ^2 , $P \leq 0.05$; * — difference from Control according to the Mann–Whitney U-criterion, $P \leq 0.05$.

Таблица 2. Противовирусная активность интраназальной формы дсРНК в экспериментах на мышах линии BALB/c, инфицированных ВГ Bishkek /01/2009 (H1N1pdm09)**Table 2. Antiviral activity of intranasal dsRNA in BALB/c mice infected with influenza Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09) virus**

Группа (n=10)	Препарат, доза	Число (%) погибших мышей	Коэффициент защиты (КЗ), %	СПЖ, сут (M±Sm)
1	Интраназальная форма дсРНК (образец 1), 2,5 мг/кг	4 (40)	40	13,30±3,80*
2	Интраназальная форма дсРНК (образец 2), 1,25 мг/кг	8 (80)	10	10,60±3,69
3	Ридостин (субстанция), 2,5 мг/кг	4 (40)	40	13,00±3,92*
4	Ридостин (субстанция), 1,25 мг/кг	8 (80)	0	9,40±3,53
5	Тамифлю, 25 мг/кг	2 [#] (20)	60	14,30±3,59*
6	Контроль	8 (80)	—	9,30±3,56

станции Ридостина, в дозе 2,5 мг/кг приводило к статистически значимому увеличению средней продолжительности жизни инфицированных мышей, при этом значения показателей в этих группах не отличались от показателя положительного контроля (препарат Тамифлю) (табл. 2). Доли выживших мышей (6 из 10) в группах 1 и 3 после введения препаратов интраназальной формы дсРНК и Ридостина были равны 60% и достоверно не отличались от данного показателя в группе сравнения (8 из 10) при введении Тамифлю (80%).

Иными словами, интраназальная форма дсРНК в дозе 2,5 мг/кг обладала противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) и А/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09), что проявлялось в увеличении числа выживших мышей и средней продолжительности жизни животных. Показатели противовирусного эффекта препарата значимо не отличались от соответствующих показателей у мышей из групп сравнения (субстанция Ридостина, препарат Тамифлю).

Учитывая широкий спектр биологического действия препаратов дсРНК, помимо изучения его эффективности, необходимо было оценить наличие/отсутствие сколько-либо значимого воздействия на ключевые физиологические системы. Для изучения фармакологической безопасности препарата было проведено исследование его влияния на функцию интегральных физиологических

систем, интенсивность основных видов обмена, структуру и функцию внутренних органов.

Результаты изучения фармакологической безопасности. Результаты физиологических и гематологических исследований. Однократное введение интраназальной формы дсРНК (2,5 мг/кг) не приводило к гибели животных, изменению их внешнего вида и поведения. Показатели массы тела, динамики её прироста и температуры тела мышей опытной группы не отличалась от показателей контрольных групп ни в один из сроков наблюдения (данные не приведены).

Однократное интраназальное введение препарата дсРНК самцам и самкам мышей не оказывало существенного влияния на гематологические показатели крови. Единственным исключением, зарегистрированным в опытной группе самцов, являлось повышение, по сравнению с контрольной группой (физиологический раствор), значений гематокрита (на 28%, 7-е сутки).

Результаты биохимических исследований. В ходе биохимического исследования был определен уровень маркерных показателей крови, отражающих интенсивность основных видов обмена веществ. Интенсивность белкового обмена оценивали по содержанию в сыворотке крови общего белка, альбумина и мочевины, углеводный обмен — по содержанию глюкозы, липидный — по уровню холестерина и триглицеридов. Функ-

Таблица 3. Биохимические показатели крови самок белых аутбредных мышей ICR после однократного введения интраназальной формы дсРНК (2,5 мг/кг)

Table 3. Blood biochemical parameters of female white outbred ICR mice post single administration of intranasal dsRNA (2.5 mg/kg)

Наименование показателя	Группы животных, получавших препараты (n=10)					
	Физиологический раствор	Буфер интраназальной формы	Интраназальная форма дсРНК, 2,5 мг/кг	Физиологический раствор	Буфер интраназальной формы	Интраназальная форма дсРНК, 2,5 мг/кг
	Через 5 ч после введения	Через 5 ч после введения	Через 5 ч после введения	Через 1 сут после введения	Через 1 сут после введения	Через 1 сут после введения
Общий белок, г/л	52,4±1,3	50,8±1,1	51,6±0,7	50,9±1,2	53,4±1,0	53,3±0,9
Альбумин, г/л	29,8±1,4	31,1±0,5	32,3±0,4	31,7±0,7	32,2±0,4	32,6±0,5
Мочевина, ммоль/л	5,69±0,33	3,70±0,59	5,28±0,39	6,08±0,33	6,46±0,21	6,53±0,34
Глюкоза, ммоль/л	8,28±0,48	9,13±0,42	8,93±0,19	7,82±0,28	8,18±0,24	7,88±0,44
Общий холестерин, ммоль/л	2,94±0,08	3,06±0,16	3,05±0,17	2,90±0,06	3,00±0,32	3,15±0,16
Триглицериды, ммоль/л	3,05±0,34	2,66±0,33	3,18±0,15	2,73±0,15	2,78±0,28	2,48±0,13
Общий билирубин, мкмоль/л	1,08±0,14	1,54±0,24	1,42±0,12	2,20±0,45	2,04±0,11	2,18±0,04
Аланинаминотрансфераза, Е/л	39,1±2,7	41,0±2,7	48,2±4,7	27,5±2,1	28,6±2,2	26,9±2,0
Аспартатаминотрансфераза, Е/л	139,7±9,9	152,1±9,1	146,7±12,0	114,3±8,0	153,0±8,5	142,8±8,1
Щелочная фосфатаза, Е/л	743±85	779±20	737±40	660±47	622±43	637±49
Калий, ммоль/л	7,24±0,14	6,92±0,35	7,41±0,25	6,85±0,33	7,66±0,37	8,01±0,27
Кальций, ммоль/л	2,32±0,05	2,37±0,02	2,41±0,02	2,41±0,03	2,40±0,05	2,43±0,03
Хлориды, ммоль/л	113,1±1,2	115,2±1,5	114,0±1,1	109,8±0,3	113,0±0,5	114,7±0,6
					*p=0,0122	*p=0,0122
Магний, ммоль/л	1,38±0,04	1,34±0,05	1,38±0,03	1,30±0,03	1,33±0,02	1,36±0,04
Фосфор, ммоль/л	3,38±0,07	3,30±0,06	3,47±0,13	3,24±0,15	3,28±0,15	3,57±0,15

Примечание. Здесь и в табл. 4: * — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили физиологический раствор, $p < 0,0170$; n — число животных в группе.

Note. Here and Table 4: * — statistically significant difference compared to the group of mice administered with saline solution, $P < 0.0170$; n — number of animals in the group.

ционирование пищеварительной системы оценивали по показателям, отражающим структуру и функцию печени, желчевыводящих путей (общий белок, альбумин, общий билирубин, аланинаминотрансфераза (АлТ), аспартатаминотрансфераза (АсТ), щелочная фосфатаза) и поджелудочной железы (глюкоза, триглицериды). Для выявления возможных нарушений работы сердечно-сосудистой системы проведено определение таких показателей, как аспартатаминотрансфераза (АсТ), общий холестерин и триглицериды. Показатели содержания в крови белка, мочевины и электролитов (калий, кальций, хлориды) были использованы для характеристики функции выделительной системы, в частности, почек. Анализ содержания в крови ионов магния и фосфора позволил оценить баланс электролитов, свидетельствующий о функции костно-мышечной, нервной и выделительной систем организма.

Исследование показало, что однократное введение дсРНК в интраназальной форме не оказывало значимого влияния на метаболизм белков, углеводов и липидов опытных мышей (табл. 3).

Не обнаружено существенных различий и в показателях крови, отражающих функционирование пищеварительной и сердечно-сосудистой систем опытных и контрольных животных.

Анализ состояния выделительной системы, в целом, не обнаружил влияния препаратов на функцию почек. Единственным выявленным от-

личием было незначительное по величине превышение концентрации хлоридов после введения интраназальной формы дсРНК (на 4,5%) к концу первых суток относительно показателя животных, получавших физиологический раствор. При этом надо отметить, что аналогичное изменение, не выходящее за пределы диапазона физиологической нормы, наблюдалось и в контрольной группе мышей после введения буфера разведения, что свидетельствует о его неспецифическом характере. Изменения других электролитов — калия, кальция, магния и фосфора, в крови опытных животных не обнаружено.

Патоморфологическое исследование показало, что однократное введение интраназальной формы дсРНК не оказывало влияния на размер, форму и цвет области введения — наружного носа и носовых отверстий. У мышей всех экспериментальных групп перечисленные органы и ткани без признаков отёчности и покраснения. Изменений в количестве и характере выделений из носа у животных опытной и контрольных групп не отмечено. Влияния препарата на весовые индексы внутренних органов самок мышей через 1 и 7 сут не наблюдалось (данные не показаны). Единственным изменением в группе самок мышей было незначительное снижение (на 9%) весовых индексов правой и левой почек на 7-е сутки по сравнению с показателями животных контрольной группы (физиологический раствор).

Таблица 4. Относительная масса внутренних органов самцов белых аутбредных мышей ICR после однократного введения интраназальной формы дсРНК (2,5 мг/кг)

Table 4. Relative weight of internal organs of male white outbred ICR mice post single administration of intranasal dsRNA (2.5 mg/kg)

Группы животных, получавших препараты (n=10)	Масса животного, г	Весовые индексы органов, ×10, мг/г						
		сердце	легкое	печень	почки		селезёнка	тимус
					левая	правая		
Через 1 сутки после введения								
Физиологический раствор	21,7±0,2	48,9±1,4	75,4±2,7	581±11,5	63,6±2,3	67,3±3,1	64,6±5,1	45,3±1,7
Буфер интраназальной формы	21,6±0,6	48,0±2,4	80,4±4,8	569±7,9	64,4±1,1	66,9±0,9	51,9±1,5	52,1±3,2
Интраназальная форма дсРНК	21,9±0,4	48,0±1,6	75,4±3,1	544±8,0	64,1±1,3	66,7±1,7	62,1±2,0	50,6±2,1
Через 7 суток после введения								
Физиологический раствор	26,9±0,8	54,3±1,2	77,9±3,9	635±16,2	70,1±0,7	71,5±1,3	64,3±3,9	43,7±1,9
Буфер интраназальной формы	27,2±0,6	57,1±4,8	78,1±1,7	645±29,2	71,6±2,4	72,2±2,1	49,3±4,6	43,4±2,8
Интраназальная форма дсРНК	27,1±0,8	58,9±2,1	78,6±1,8	615±12,8	63,8±0,5	65,3±0,7	49,2±2,1	46,4±1,7
					*p=0,012		*p=0,012	

(табл. 4). В ходе гистологического изучения не выявлено влияния препарата на микроструктуру органов и тканей мышей через 5 ч, 1 и 7 сут после однократного интраназального введения.

Таким образом, интраназальная форма дсРНК в дозе 2,5 мг/кг не приводила к гибели мышей или появлению внешних признаков интоксикации, не вызывала изменения массы и температуры тела, уровня гематологических показателей. Препарат дсРНК не оказывал влияния на маркерные биохимические показатели крови, макро- и микроскопическую картину внутренних органов, на основании чего сделан вывод об отсутствии у препарата токсического воздействия на основные физиологические системы организма (сердечно-сосудистую, пищеварительную, выделительную) и интенсивность основных видов обмена (белковый, углеводный, липидный).

Заключение

На модели гриппозной инфекции показано, что интраназальная форма препарата дсРНК при лечебно-профилактической схеме применения повышает выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, инфицированных летальными дозами вируса сезонного гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и вируса гриппа с пандемическим потенциалом A/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09). Защитный эффект препарата на модели инфекции, вызванной вирусом A/Bishkek/01/2009, был сравним с эффектом препарата Тамифлю. Отсутствие токсического воздействия интраназальной формы дсРНК в фармакологической дозе на организм лабораторных мышей, состояние физиологических систем организма и основные виды обмена позволяет сделать вывод о фармакологической безопасности препарата.

Литература/References

1. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двуспиральных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии. Биомедицинская химия. 2019; 65 (4): 277–293. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. [Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G. M. Development of drugs on the basis of high-polymeric double-stranded RNA

Полученные данные подтверждают перспективность и обоснованность продолжения работ по завершению разработки новой лекарственной формы дсРНК для интраназального применения в качестве средства профилактики и лечения гриппа и других острых респираторных вирусных заболеваний.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование проведено в рамках работ по выполнению государственного задания ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, тема ГЗ-38/21.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Участие авторов. Гамалей С. Г. — интерпретация результатов фармакологической безопасности, написание статьи; Шими́на Г. Г. — оценка влияния препарата на физиологические и гематологические показатели мышей; Цыпленкова Е. С. — проведение эксперимента по оценке фармакологической безопасности; Скарнович М. О., Скарнович М. А. — оценка противовирусных свойств препаратов; Шишкина Л. Н. — анализ и интерпретация данных противовирусной активности препаратов; Таранов О. С. — гистологическая оценка влияния препарата на органы и ткани мышей; Симакова О. В. — оценка влияния препарата на биохимические показатели крови мышей; Иванова О. С. — получение и характеристика интраназальной формы препарата дсРНК; Левагина Г. М. — выбор рецептуры интраназальной формы препарата дсРНК; Даниленко Е. Д. — постановка задачи, окончательное редактирование статьи.

- for antiviral and antitumor therapy. Biomeditsinskaya Khimiya. 2019; 65 (4): 277–293. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. (in Russian)]
2. Иванова О.С., Левагина Г.М., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н., Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д. Получение и характеристика препарата двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для интраназального применения. Биофармацевтический журнал. 2019; 11 (4): 29–33. [Ivanova O.S., Levagina G.M., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A., Shishkina L.N., Gamaley S.G., Danilenko E.D. Obtaining

and characterization of double stranded RNA preparation from *Saccharomyces cerevisiae* yeast for intranasal application. Biofarmatsevticheski Zhurnal. 2019; 11 (4): 29–33. (in Russian)]

3. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. / Под ред. Белозерцевой И.В., Блинова Д.В., Красильниковой М.С. Восьмое издание. пер. с англ. — М.: ИРБИС; 2017. [Guide for the care and use of laboratory animals. 8th. ed. Belozerceva I.V., Blinov D.V., Krasil'shnikova M.S., eds. Moscow: Irbis; 2017. (in Russian)]
4. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Пер. с англ. RusLasa. — С-ПБ; 2012. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Translated by RusLasa. — S-PB; 2012.] Доступно по: [https://ruslasa.ru/wp-content/up-](https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf)

- loads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf. Ссылка активна на 20.07.2022. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур; ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. [GOST 33215-2014 Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila oborudovaniya pomeshchenii i organizatsii protsedur; GOST 33216-2014 Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila soderzhaniya i ukhoda za laboratornymi gryzunami i krolnikami. (in Russian)]
6. Новицкий В.В., Евтушенко О.М. Руководство к практическим занятиям по гематологии. Томск; 1999. [Novitskiy V.V., Evtushenko O.M. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po gematologii. Tomsk; 1999. (in Russian)]

Информация об авторах

Гамалей Светлана Георгиевна — зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Шими́на Галина Георгиевна — научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-1078-7033.

Цыпленкова Елена Сергеевна — младший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-1277-6258

Симакова Ольга Владимировна — младший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-1222-7574

Скарнович Максим Олегович — старший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Скарнович Мария Александровна — научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 6381-5817. Scopus Author ID: 57189059427

Шшикина Лариса Николаевна — д. б. н., зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Таранов Олег Святославович — зав. отделом микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-6746-8092. ResearcherID: A-5657-2014. eLIBRARY SPIN-код: 5894-6518. Scopus Author ID: 8938697800

Иванова Ольга Сергеевна — к. б. н., научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310

Левагина Галина Михайловна — к. б. н., зав. отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Даниленко Елена Дмитриевна — к. б. н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682

About the authors

Svetlana G. Gamaley — Head of the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Galina G. Shimina — Researcher at the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-1078-7033

Elena S. Tsyplenkova — Junior researcher at the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-1277-6258

Olga V. Simakova — Junior researcher at the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-1222-7574

Maxim O. Skarnovich — M. D., Senior researcher at the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Maria A. Skarnovich — Researcher at the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 6381-5817. Scopus Author ID: 57189059427

Larisa N. Shishkina — D. Sc. in Biology, Head of the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Oleg S. Taranov — Head of the Department of Microscopy, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzorg, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-6746-8092. ResearcherID: A-5657-2014. eLIBRARY SPIN-код: 5894-6518. Scopus Author ID: 8938697800

Olga S. Ivanova — Ph. D. in Biology, Researcher at the Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310

Galina M. Levagina — Ph. D. in Biology, Head of the Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Elena D. Danilenko — Ph. D. in Biology, Director of the Institute of Medical Biotechnology, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682