

Доклиническое исследование мутагенной безопасности вакцины против пневмококковой инфекции на основе рекомбинантного гибридного белка

Г.П. Косякова, А.А. Лебедев, С.С. Пюрвеев

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Preclinical study of mutagenicity and safety of a vaccine against pneumococcal infection based on a recombinant hybrid protein

G. Kosyakova, A. Lebedev, S. Pyurveev

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

© Коллектив авторов, 2023 г.

Резюме

Пневмококковая инфекция является причиной пневмоний. Вакцинация позволяет предотвратить тяжелое течение данного заболевания. Рассматриваемая в работе пневмококковая вакцина создана генномодифицированным путем на основе гибридного рекомбинантного белка. **Целью исследования** было доклиническое изучение мутагенной, генетической безопасности новой пневмококковой вакцины Айривакс против пневмококковой инфекции у крыс. **Материалы и методы исследования.** Исследования вакцины Айривакс проведены у крыс-самцов линии Вистар на клеточных популяциях костного мозга и мононуклеарах периферической крови. Изучали кариотипическую стабильность клеток и миелограмму костного мозга. **Результаты.** После введения вакцины содержание клеток лимфоидного роста в крови крыс было повышено до 74,2% ($p < 0,05$), что доказывает иммунный ответ организма. Клетки с нестабильным геномом как показатель генетической безопасности AL-вакцины встречались и у экспериментальных, и у контрольных животных редко, с частотой не бо-

лее 1,5%. **Заключение.** Таким образом, новая пневмококковая вакцина Айривакс и ее компоненты обладают мутагенной и токсической безопасностью.

Ключевые слова: пневмококковая вакцина, гемопоэз, миелограмма, ДНК, кариотипическая стабильность, мутагенная безопасность

Summary

Pneumococcal infection is the cause of pneumonia. Vaccination can prevent the severe course of this disease. The pneumococcal vaccine considered in the work was created by a genetically modified method based on a hybrid recombinant protein. The aim of the work was preclinical investigation of the mutagenic, genetic safety of the new pneumococcal vaccine, Irivax, against pneumococcal infection in rats. **Materials and methods.** Studies of the Irivax vaccine were carried out in male Wistar rats' cell populations of the bone marrow and peripheral blood mononuclear cells. The karyotypic stability of cells and myelogram of the bone marrow were studied. **Results.** After the introduction of the

vaccine, the content of the lymphoid germ cells in the blood of rats was increased to 74.2% ($p < 0.05$), which proves the body's immune response. The frequency of cells with an unstable genome, as an indicator of the genetic safety of the AL-vaccine, was rare both in experimental and control animals, and did not exceed 1.5%.

Conclusion. Thus, the new pneumococcal vaccine Irivax and its components have mutagenic and toxic safety.

Keywords: pneumococcal vaccine, hematopoiesis, myelogram, DNA, karyotypic stability, mutagenic safety

Введение

Пневмококковая инфекция — распространенная причина тяжелых пневмоний у людей как в развитых, так и в развивающихся странах. Внезапная вспышка COVID-19, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, переросла в пандемию, которая вызвала развитие у пациентов острого респираторного синдрома и легочного фиброза. Вакцинация является единственным средством, которое позволяет предотвратить тяжелое и смертельное течение данного заболевания. В правилах надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств [1, 2] указывается: «Вакцины — иммунобиологические препараты для создания искусственного активного специфического иммунитета с целью профилактики инфекционных заболеваний (реже — отравлений ядами, опухолей, некоторых неинфекционных заболеваний).

Требования к вакцинам (критерии эффективности вакцин):

- 1) иммуногенность (иммунологическая эффективность, протективность); в 80–95% случаев вакцины должны создавать напряженный и длительный специфический иммунитет;
- 2) безопасность — вакцины не должны быть причиной заболевания или смерти» [1, 3].

Применяемые в настоящее время вакцины, созданные с использованием живых вирусов, могут обладать рядом побочных эффектов. И поэтому мы предлагаем кандидатскую пневмококковую вакцину Айривакс, созданную на основе гибридного рекомбинантного белка, и изучаем ее доклиническую иммуногенность и мутагенную безопасность.

В настоящее время появляется все большее количество химических веществ, которые требуют определения степени их вредного воздействия и их безопасности, что является неотъемлемым этапом доклинических исследований [4]. Результаты зарубежных и отечественных исследований демонстрируют, что несколько применяемых в настоящее время лекарственных препаратов и вакцин обладают генотоксическими, мутагенными свойствами, поэтому их использование должно быть ограничено. За действием таких веществ необходимо наблюдать в доклини-

ческом исследовании. К таким препаратам относится, в частности, напроксен [4, 5], применяемый в качестве обезболивающего и для уменьшения воспалительных процессов, а также современные противоопухолевые препараты, такие как циклофосфан (ЦФ), паклитаксел, цисплатин [6]. Исследователь О.В. Неупокоева показала (2015), что тиофан и экстракт трансформированных корней шлемника байкальского не обладают индуцированным мутагенезом [7]. И поэтому мы предлагаем обязательно проверять новые лекарственные препараты на мутагенную безопасность. По данным проверки на мутагенность и канцерогенность лекарственные средства на основе тридекапептида показывают безопасность в тесте Эймса и в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей [8]. Вакцины — это высокомолекулярные вещества, к ним относятся соединения с молекулярной массой более 10 000 кДа [9].

Известно, что микроядерный тест является одним из надежных методов оценки мутагенной безопасности [7]. В то же время применяются и другие тесты биомониторинга, такие как микроэлектрофорез ДНК одиночных клеток *in vivo* [4, 7]. Микроядра (MN) — это внеядерные тела, которые содержат поврежденные фрагменты хромосом и/или целые хромосомы, которые не были включены в ядро после деления клетки.

В настоящее время производится большое число вакцин, которые требуют оценки степени их воздействия на организм [1]. Если мутагенный эффект препарата зарегистрирован хотя бы в одном эукариотическом тесте, это говорит о наличии у него мутагенных свойств. Применяемые в настоящее время вакцины могут обладать рядом побочных эффектов [8]. Исследования мутагенности проводятся на этапе доклинического изучения и предусматривают оценку способности лекарственных средств и вакцин к индукции разных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках [9]. Если фармакологическое средство будет отличаться высокой степенью генотоксичности, то есть оказывать повреждающее воздействие на генетический материал, то его уже нельзя использовать с лечебной целью [9, 10]. В частности, Н.В. Томилиным с помощью микроядерного теста на лимфоцитах и ретикулоцитах крови человека и крысы была проведена оценка генотоксического и цитотоксического

действия фармакологических средств, этилметансульфоната, митомицина С и циклофосамида [9, 11].

Для оценки генотоксических свойств препаратов и вакцин используют набор методов. В частности, применяются микроядерный эритроцитарный тест при изучении молодых полихроматофильных (ПХЭ) и зрелых нормохромных эритроцитов (НХЭ), а также микроэлектрофорез ДНК одиночных клеток в клетках костного мозга [5, 10]. Однако в вакцинах соединения алюминия (гидроксид алюминия и фосфат алюминия) являются наиболее распространенными адъювантами, используемыми в современных вакцинах. Адъювант — это соединение или комплекс веществ, добавляемый в вакцины и предназначенный для усиления иммунного ответа [12]. Именно поэтому адъюванты также изучаются на генотоксичность как самостоятельно, так и в комплексе с вакциной. Исследованная в настоящей работе пневмококковая вакцина Айривакс создана биотехнологическим генно-инженерным способом с адъювантом алюминия [13].

Цель исследования

Целью нашего исследования было изучить мутагенную, генетическую безопасность новой пневмококковой вакцины Айривакс.

Материалы и методы исследования

Доклинические исследования генетической безопасности пневмококковой вакцины Айривакс с адъювантом алюминия проведены у 56 крыс самцов линии Вистар. Вакцину исследовали на клеточных популяциях костного мозга и клетках периферической крови крыс. Определяли лейкоцитарную формулу, изучали кариотипическую стабильность мононуклеаров периферической крови, миелограмму костного мозга и частоту клеток с повреждениями методом микроэлектрофореза ДНК одиночных клеток. Пневмококковую вакцину (Айривакс, AL-вакцину) вводили интраназально в дозе 40 мкг в 20 мкл растворителя в каждую ноздрю. Контролем служило введение аналогичного объема растворителя AL-плацебо (20 мкл) и физиологического раствора.

Определение некоторых фракций лейкоцитарной формулы крови проводили согласно стандартной методики [10]. Мазки готовили из периферической крови, фиксировали 96% раствором этилового спирта, окрашивали красителем Романовского–Гимзы. После высушивания анализировали препараты. Вычисляли процентное соотношение лейкоцитов. На каждом препарате просматривали не менее 500 мононуклеаров, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и лимфоциты. Помимо лейкоцитов с целыми ядрами и цитоплазмой, учи-

тывали также клетки с элементами деструкции ядер. Расчет миелограммы проводили стандартным методом. Клетки костного мозга получали вымыванием из тазобедренных косточек подопытных крыс физиологическим раствором 1% натрия хлорида, ткани измельчали ножницами в питательной среде 199, пипетировали и фильтровали. Далее проводили двукратное промывание центрифугированием в течение 10 минут при 1000 об./мин. Осевшую суспензию клеток наносили тонким слоем на предметное стекло и с помощью стекла с отшлифованным краем производили мазок средней толщины. Обследованные клетки располагались равномерно одним слоем на 1/3 площади поверхности мазка. Приобретенные мазки фиксировали 96% раствором этанола, окрашивали красителем Романовского–Гимзы. В дальнейшем анализировали не менее 500 ядросодержащих кровяных клеток. Расчет миелограммы проводился на основании стандартной методики [12].

Анализ клеток с морфологическими нарушениями ядер и микроядрами на гематологических препаратах и препаратах костного мозга

Гематологические препараты периферической крови готовили стандартным способом: на чистые обезжиренные предметные стекла наносили каплю крови и с помощью стекла с отшлифованным краем изготавливали мазок средней толщины [13]. Полученные мазки высушивали, фиксировали 96% раствором этилового спирта, после этого окрашивали по Романовскому–Гимзе.

Частоту встречаемости эритроцитов с микроядрами, костного мозга с поврежденными клетками определяли на гематологических препаратах и «кляч»-препаратах костного мозга под иммерсией на микроскопе Carl Zeiss (Германия) при увеличении об. 100, ок. 10.

Анализ под микроскопом проводили в области нижней трети мазка, в которой клетки располагались равномерно. Частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами и «хвостатыми» ядрами проявляли в промилле (‰). Изучаемые клетки не должны были иметь признаков дегенерации и повреждений.

При электрофорезе ДНК одиночных клеток выделяли костный мозг бедренной кости задней конечности, полученный от самцов крыс. Костный мозг помещали в среду 199, рассекали скальпелем в продольной плоскости, готовили отпечатки или патикул на обезжиренные предметные стекла, смоченные физиологическим раствором. Фиксацию проводили 96% раствором этилового спирта, после фиксации препараты окрашивали красителем Романовского–Гимзы [11, 15].

Перемешивали 15 мкл клеточной суспензии (из расчета 5000 клеток на 15 мкл) с 75 мкл 0,5% легкоплавкой агарозы (ICN) при 37 °С и немедленно наносили на матированное предметное стекло, предварительно покрытое слоем 1% нормальной агарозы (ICN) [11, 16]. Полученный таким образом двухслойный «пирог» инкубировался в течение часа в темноте при 4 °С в лизирующем растворе (рН 10), содержащем 10 ммоль Tris-[hydroxymethyl] aminomethane, 2,5М NaCl, 100 мМ EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), а также 10% ДМСО (диметилсульфоксид, C₂H₆SO) для предотвращения неконтролируемого образования разрывов ДНК в 1% тритоне X-100 и для форсирования лизиса ДНК [17].

По окончании инкубации в лизирующем растворе препараты помещали в электрофоретический буфер на 40 мин (рН>13,0) для конверсии щелочеллабильных сайтов в одностранные разрывы ДНК и в дальнейшем проводили электрофорез при напряжении 0,75 В/см в течение 20 мин. Для нейтрализации щелочного раствора слайды отмывали три раза по 5 мин в 0,4 М трис-Cl буфере. Для обнаружения поврежденных костномозговых клеток окрашивание нитратом серебра проводили согласно N. Kizilian и соавт. [18].

Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ Graph Pad Prizm v.5, SPSS Sigma Stat 3.0 и Minitab 14. Для сравнения контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона для парных сравнений.

Результаты и их обсуждение

Некоторые фракции лейкоцитарной формулы периферической крови самцов крыс при введении пневмококковой вакцины представлены на первом этапе исследований в табл. 1.

Таблица 1

Некоторые фракции лейкоцитарной формулы периферической крови самцов крыс при введении пневмококковой вакцины (n=18 ♂), %

Группа	Контроль	AL-плацебо	AL-вакцина
Эозинофилы	2,27±0,18	2,59±0,28	2,42±0,16
Нейтрофилы	21,2±1,04	22,8±1,29	24,7±1,46
Моноциты	2,15±0,18	2,68±0,21	3,17±0,42
Лимфоциты	68,9±1,68	69,2±1,05	74,2±1,31*, **
Разрушенные ядродержащие клетки	1,12±0,22	1,42±0,20	1,6±0,20

Примечание: *p<0,05 по отношению к контролю; **p<0,05 по отношению к AL-плацебо.

В ходе работы обнаружено снижение количества эозинофильных лейкоцитов в периферической крови животных после вакцинации. Выявлены изменения в количественном соотношении клеточных популяций лимфоцитов и разрушенных ядродержащих клеток. Содержание клеток лимфоидного ростка в крови животных после введения вакцины было повышено до 74,2% (см. табл. 1) (p<0,05), что доказывает иммунный ответ организма, так как лимфоциты отвечают за иммунный ответ в целом и иммунную память. В группе экспериментальных животных при определении разрушенных ядродержащих клеток крови достоверных различий не выявлено (см. табл. 1).

При введении AL-плацебо сравнение средних частот встречаемости моноцитов показало тенденцию к повышению. При введении AL-вакцины также наблюдалось повышение этого показателя. Частота

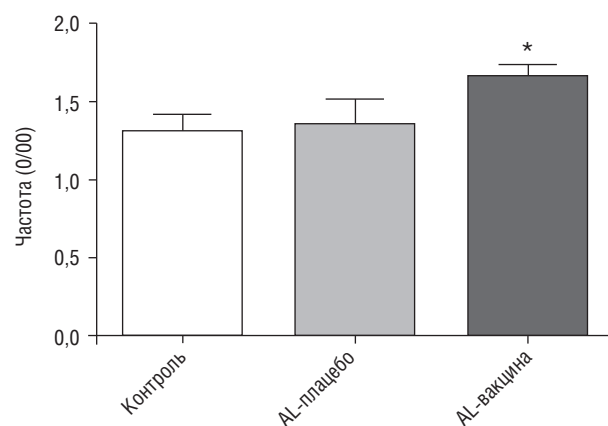


Рис. 1. Частота выявления эритроцитов с микроядрами в периферической крови крыс после введения пневмококковой вакцины.

Примечание: по оси ординат — частота выявления клеток с повреждениями. * p<0,05 по отношению к контролю (n=18 ♂)

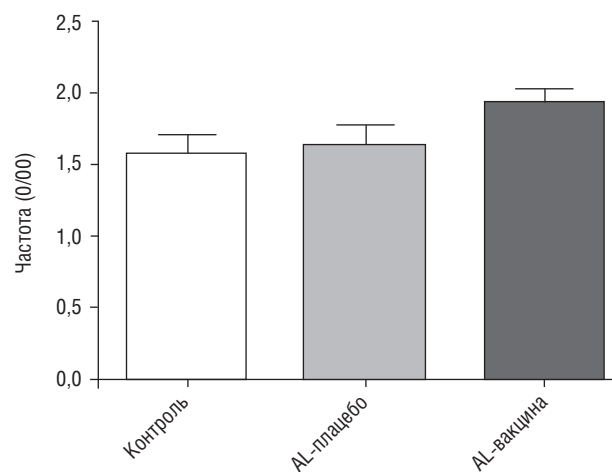


Рис. 2. Частота выявления лимфоцитов с микроядрами в периферической крови крыс при введении пневмококковой вакцины

Примечание: по оси ординат — частота выявления клеток с повреждениями (n=18 ♂)

выявления эритроцитов с микроядрами в периферической крови крыс после введения пневмококковой вакцины представлена на рис. 1.

Частота выявления лимфоцитов с микроядрами в периферической крови крыс при введении пневмококковой вакцины представлена на рис. 2.

Кариотипическая стабильность периферической крови крыс при введении пневмококковой вакцины показана на рис. 1 и 2. Частота обнаружения эритроцитов с микроядрами достоверно выше при введении AL-вакцины ($p < 0,05$). Напротив, частота выявления лимфоцитов с микроядрами в опытных группах не отличались от контрольной группы крыс.

Миелограмма костного мозга подопытных крыс при введении AL-плацебо и AL-вакцины в сравнении с контролем представлена в табл. 2.

Миелограмма костного мозга показывает, что базофильные нормобласты в опыте выше, чем в контроле. Это свидетельствует, что базофилы помогают другим лейкоцитам обнаруживать чужеродные частицы.

Микроэлектрофорез ДНК одиночных клеток костного мозга (МФК) показан при разных фазах введения пневмококковой вакцины (рис. 3). Клетки были неодинаковыми, с разной структурой выраженности:

Таблица 2

Миелограмма костного мозга подопытных крыс при введении AL-плацебо и AL-вакцины в сравнении с контролем (n=18 ♂), M±m

Клетки костного мозга	Контроль (вода), %	Опыт (AL-плацебо), %	Опыт (AL-вакцина), %
Базофильные нормобласты	1,58±0,11	1,82±0,14	2,08±0,09*
Полихроматофильные и оксифильные нормобласты	16,8±0,49	17,62±0,46	17,03±0,57
Промиелоциты	1,8±0,09	1,84±0,14	2,07±0,21
Миелоциты, метамиелоциты	16,5±1,04	17,02±1,63	16,58±0,51
Палочкоядерные	16,4±1,10	15,88±1,37	16,72±0,82
Сегментоядерные	14,8±1,35	14,62±1,87	12,98±0,69
Эозинофилы, базофилы	3,97±0,19	4,59±0,21**	4,01±0,27
Моноциты	2,08±0,10	2,24±0,27	2,63±0,41
Лимфоциты	8,73±0,84	9,36±1,10	10,22±0,98
Мегакариоциты	9,17±4,3	10,5±3,5	10,5±3,5
Недифференцированные бласты, миелобласты, проэритробласты	3,82±0,22	4,59±0,47	3,69±0,29
Митозы	0,3±0,01	0,3±0,02	0,4±0,02

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по отношению к контролю.

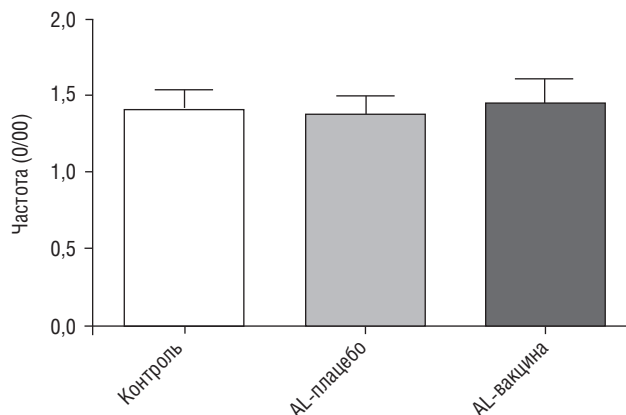


Рис. 3. Частота клеток с повреждениями, выявленная методом микроэлектрофореза ДНК одиночных клеток костного мозга у самцов крыс линии Вистар при разных фазах введения пневмококковой вакцины.

Примечание: по оси ординат — частота выявления клеток с повреждениями; частота — частота обнаружения клеток с нестабильным геномом (n=15 ♂)

кометообразной и округлой формами, поэтому при МФК получены разнообразные результаты. Клетки костного мозга с нестабильным геномом отличались от неповрежденных кометообразной формой, а клетки со стабильным геномом были округлыми.

Мутагенную безопасность AL-вакцины определяли при подсчете частот клеток с повреждениями, методом микроэлектрофореза ДНК одиночных клеток у самцов линии Вистар (15 особей).

Выявлены незначительные повреждения клеток костного мозга у крыс (рис. 3). Частота обнаружения клеток с нестабильным геномом, выявленная в контроле и при введении пневмококковой вакцины, не отличалась от контрольных показателей и от показателей групп грызунов, которым вводили AL-плацебо. Наши данные согласуются с выводами Б.А. Гаврилова (2016) [5].

Гемопоз, изменение показателей периферической крови и иммунореактивность у крыс при введении вакцины были незначительными. Изучили клеточное соотношение форменных элементов периферической крови (некоторые фракции формулы белой крови) у крыс линии Вистар при интраназальном введении пневмококковой вакцины и контрольной группы. Кроме того, установили частоту выявления клеток с элементами деструкции. Полученные нами результаты во многом согласуются с данными литературы [14, 19].

Выявили, что микроядра и другие ядерные аномалии, такие как нуклеоплазматические мостики и ядерные почки, являются биомаркерами хромосомной нестабильности. Эти генотоксические изменения были измерены с помощью анализа микроядерного теста. Молекулярные механизмы, приводящие к данным патологическим процессам, были исследованы другими

авторами в течение последних двух десятилетий с использованием молекулярных зондов и генетически модифицированных клеток [14, 20]. Эти исследования во многом объяснили формирование ядерных аномалий, которые обычно повышают риск развития дегенеративных заболеваний.

Микроядра могут образовываться во время анафазы из отстающих фрагментов ацентрической хромосомы или хроматиды, вызванных неправильным восстановлением разрывов ДНК. Неправильная сегрегация целых хромосом в анафазе также может привести к образованию микроядер в результате гипометилирования [14, 19]. Увеличение частоты обнаружения эритроцитов и лимфоцитов с микроядрами является положительной реакцией на введение в организм антигенов вакцины. Хотя следует отметить, что у самцов опытной группы имеет место тенденция к повышению частоты обнаружения микроядер как в эритроцитах периферической крови, так и в лимфоцитах при введении AL-вакцины, что определяет ответную реакцию организма на введение чужеродного белка.

Нами также изучена миелограмма костного мозга при введении вакцины. Наблюдался количественный сдвиг в соотношении отдельных пулов кроветворения. Характеристика влияния вакцины на состояние гемопоэза животных представлена в табл. 2.

Полученные результаты выявили неоднозначные тенденции в процессах регенерации популяций кроветворных клеток. В частности, после введения AL-плацебо процентное содержание палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге у контрольных крыс составило $31,2 \pm 2,45$, а содержание нейтрофилов снизилось до $30,5 \pm 3,24$. После введения AL-вакцины самцам крыс наблюдалось также снижение содержания зрелых нейтрофилов в костном мозге $29,7 \pm 1,51$. То есть имело место незначительное снижение содержания зрелых нейтрофилов при вакцинации (см. табл. 2). Эта тенденция свидетельствует об отсутствии влияния вакцины на процентное содержание палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов [21].

После введения пневмококковой вакцины содержание нормобластов увеличивалось незначительно. Содержание эозинофилов и базофилов в костном мозге у животных контрольной группы составило $3,97 \pm 0,19$, при этом наблюдалось достоверное повышение процентного содержания этих клеток при AL-плацебо. Однако показано отсутствие проявления реакции на введение пневмококковой AL-вакцины других клеток (показатель эозинофилов, базофилов $4,01 \pm 0,27\%$). Реакция организма проявляется только при введении AL-плацебо — $4,59 \pm 0,21\%$ (см. табл. 2).

Количество клеток-предшественников лимфоидного ряда составило в контроле $8,73 \pm 3,08$, после введения AL-плацебо мы обнаружили повышение со-

держания лимфоцитов до $9,36 \pm 1,10\%$, а при AL-вакцинации — до $10,22 \pm 0,98\%$ соответственно (см. табл. 2). Содержание миелоцитов и метамиелоцитов в норме составило $16,5 \pm 1,04\%$, а после введения AL-вакцины по сравнению с контрольными показателями содержание миелоцитов и метамиелоцитов не увеличивалось. В группе контроля и после введения вакцины количество гемогистобластов в костном мозге составило $1,7 \pm 0,31\%$, что показывает положительный иммунный ответ организма крыс на введение вакцины. Показатели гемопоэза у крыс в контроле и опыте были в пределах нормы.

Также получены достоверные различия содержания базофильных нормобластов между контролем и введением AL-вакцины, содержания эозинофилов и базофилов — между контролем и введением AL-плацебо (при $p < 0,01$). Это доказывает, что костномозговое кроветворение и некоторые показатели периферической крови положительно реагируют на иммунный ответ при введении пневмококковой вакцины крысам.

Наши данные согласуются с данными А.В. Лаврова и соавт. (2011) [22]. Впервые упорядоченное расположение хромосом в интерфазном ядре было отмечено еще в конце XIX в. [18, 23]. В связи с совершенствованием методов микроскопии и молекулярной биологии изучение гетерохроматиновой архитектоники ядра стало возможно лишь к концу XX в. В настоящее время считается, что неслучайное расположение хромосомных территорий в интерфазном ядре является важным механизмом эпигенетической регуляции различных клеточных процессов (клеточный цикл, дифференцировка, ответ на введение вакцины). Пространственная организация хроматина участвует в регуляции работы генома, в клеточных реакциях на внешние воздействия, в патогенезе иммунного ответа на вакцину [22, 24].

Заключение

Таким образом, в настоящей работе произведены прогнозирование, оценка течения и силы действия вакцины на гемопоэз и иммунный ответ организма лабораторных животных. Как следует из полученных нами данных, частота клеток с нестабильным геномом встречалась в контроле у самцов крыс, как правило, редко и не превышала 1,5% как при введении AL-вакцины, так и в контроле. Это доказывает ее генетическую безопасность (см. рис. 3).

Таким образом, можно сделать следующие выводы: при введении AL-вакцины в периферической крови подопытных животных наблюдалось повышение содержания лимфоцитов; изменялась синтетическая активность мононуклеаров костного мозга; выявлено повышение содержания эозинофилов и базофилов в костном мозге. В периферической крови при введении

вакцины Айривакс у грызунов не выявлено повышения частоты клеток с апоптотическими изменениями в сравнении с контрольными животными. Проведенные исследования изученной пневмококковой вакцины, созданной генномодифицированным путем на основе гибридного рекомбинантного белка против пневмококковой инфекции, доказывают, что она является безопасным средством и не обладает побочными эффектами [22, 24]. Исследования мутагенной безопасности пневмококковой вакцины с алюминиевым адъювантом как вспомогательным компонентом выявили способность вакцины к отрицанию разных типов мутаций в соматических клетках периферической крови и клетках костного мозга крыс. Это было выявлено при подсчете клеток со стабильным геномом, выявленным методом микроэлектрофореза ДНК одиночных клеток. После введения AL-вакцины частота выявления клеток с нестабильным геномом в группе самцов линии Вистар тоже не имела разницы с этим показателем в контрольной группе.

Полученные в настоящей работе данные согласуются с исследованиями других авторов [25, 26]. Микроядерный тест широко применяется для определения факторов, способных вызвать поражение генетического аппарата. С помощью этого метода можно выявить цитогенетическую активность химических соединений; биологических факторов, вакцин, лекарственных препаратов, проверка безопасности которых является обязательной [27]. Подобные исследования были проведены на экстракте аврана лекарственного. Использовался сухой экстракт аврана лекарственного в дозе 200 мг/кг. Мутагеном являлся диоксидин в дозе 200 мг/кг. Анализ проводили на белых лабораторных мышах. Животные были разделены на группы: 1-я группа — получавшая воду (негативный контроль); 2-я группа — получавшая диоксидин (позитивный контроль); 3-я — группа, получавшая экстракт и диоксидин.

Вещества вводили однократно, забор крови и приготовление мазков осуществляли через сутки после введения препаратов. Подсчет эритроцитов с микроядрами проводили в расчете на 2000 эритроцитов и выражали в промилле (‰). О наличии антимуtagenного действия экстракта судили по числу эритроцитов с микроядрами в сравнении с позитивным контролем и фоновым уровнем числа микроядер (негативный контроль). Совместное введение экстракта и диоксида на первые сутки вызывало достоверное снижение числа клеток с микроядрами [13, 28].

Частота эритроцитов с микроядрами является положительной реакцией на введение в организм антигенов вакцины. Хотя следует отметить, что у самцов опытной группы имеет место небольшая тенденция к повышению частоты микроядер в эритроцитах периферической крови при введении AL-вакцины, что определяет ответную реакцию организма на введе-

ние чужеродного белка. Наши данные согласуются с данными N. Kizilian и соавт. [18].

Наши исследования показали мутагенную и токсическую безопасность пневмококковой вакцины, а также положительное воздействие ее на клеточные популяции млекопитающих. В работе мы определили прогноз, оценку течения и силу действия пневмококковой вакцины с целью применения вакцины в дальнейшем для клинических исследований. И поэтому мы рекомендуем в дальнейшем применять вакцину. При введении пневмококковой вакцины Айривакс мы изучили лейкоцитарную формулу периферической крови крыс и миелограмму костного мозга крыс линии Вистар. По лейкоцитарной формуле и клеткам костного мозга выявлены незначительные отклонения от нормы. Компоненты вакцины показали токсическую безопасность для клеток организма. Исследованы также положительные доклинические изменения клеток организма животных после введения вакцины. Обзор литературы свидетельствует, что в последнее время возникает достаточно много проблем в проведении эффективного лечения пневмококковой инфекции. Таким образом, вакцина Айривакс с точки зрения ее мутагенной и токсической безопасности имеет несомненные перспективы для практики здравоохранения. Пневмококковая инфекция вызывает тяжелое заболевание, поэтому нужны вакцины против распространения пневмоний у людей, так считают создатели других вакцин, например в Корее [29, 30]. Для борьбы с пандемией они создали ДНК-вакцину от COVID-19, вызванной новым коронавирусом SARS-COV-2.

Дополнительная информация

Вклад авторов. Существенный вклад всех авторов внесен в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, все авторы прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. *Конфликт интересов.* Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Этический комитет. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ № 424-08-14-23-010 от 01.02.2023.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (2022–2025). «Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддитивных и нейроэндокринных нарушениях и создание новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС», шифр FGWG-2022-0004.

Список литературы

1. Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81. № 73–91 ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» [Rules of good laboratory practice: of the Eurasian Economic Union in the field of circulation of medicines. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016 No. 81. No. 73–91 FGBU «Nauchnyj centr ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya» (In Russ.)].
2. Общие принципы доклинической оценки безопасности фармакологических лекарственных средств для медицинского применения. Документация медицинских организаций. Постановление Правительства РФ от 01.06.2021 № 852. Приказ МЗ № 785Н [General principles of preclinical safety assessment of pharmacological medicinal products for medical use. Documentation of medical organizations. Decree of the Government of the Russian Federation 01.06.2021 No. 852. Priказ MZ No. 785N (In Russ.)].
3. Артюнина Г.П., Игнатъкова С.А. Основы медицинских знаний. Здоровье, болезнь и образ жизни: учебное пособие для высшей школы. М.: Академический Проект, 2020. 560 с. («Gaudeamus»). ЭБС «Консультант студента» [Artyunina G.P., Ignat'kova S.A. Fundamentals of medical knowledge. Health, disease and lifestyle: textbook for higher education. Moscow: Akademicheskij Proekt, 2020: 560 («Gaudeamus»). E'BS «Konsul'tant studenta» (In Russ.)].
4. Зверева Д.Е. Использование микроядерного теста при оценке генотоксических свойств лекарственных веществ. Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области 2019; 1 (2; 25): 10–20 [Zvereva D.E. The use of micronucleus test in assessing the genotoxic properties of medicinal substances Bulletin of the Council of Young Scientists and Specialists of the Chelyabinsk Region 2019; 1 (2; 25): 10–20 (In Russ.)].
5. Гаврилов Б.А. Экспрессия рибосомных цистронов и кариотипическая нестабильность клеток животных при воздействии факторов окружающей среды: дис. канд. биол. наук: 03.00.15 [Gavrilov B.A. Expression of ribosomal cistrons and karyotypic instability of animal cells under the influence of environmental factors: dissertation of a candidate of biological sciences: 03.00.15 (In Russ.)]. <http://pharm-spb.ru/docs/conf/2016>.
6. Murbach T.S. et al. A comprehensive toxicological safety assessment of aqueous extract of *Polypodium leucotomos* (Fernblock®). Food and Chemical Toxicology 2015; 86: 328–341. doi: 10.1016/j.fct.2015.11.008.
7. Неупокоева О.В. Влияние тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского на индуцированный мутагенез: дис. канд. биол. наук. Томск, 2015: 139 [Neupokoeva O.V. Influence of thiophane and extract of transformed roots of the Baikal skullcap on induced mutagenesis: dissertation of a candidate of biological sciences. Tomsk, 2015: 139 (In Russ.)].
8. Шараф А.Х. и др. Мутагенные свойства лекарственного средства на основе тридекапептида в тесте Эймса и в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей. Вопросы экспериментальной биологии и медицины 2018 (8): 38–44 [Sharaf A.Kh. et al. Mutagenic properties of drugs based on tridecapeptide in the Ames test and in the test for counting micronuclei in mouse erythrocytes. Voprosy eksperimental'noy biologii i meditsiny 2018 (8): 38–44 (In Russ.)]. doi: 10.29296/25877313-2018-08-06.
9. Бем А.Э., Касимова А.Р. и др. Концепция мишень-опосредованного лекарственного распределения высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений. Лекарственный вестник 2021; 15 (3; 83): 3–11 [Bem A.E., Kasimova A.R. et al. The concept of target-mediated drug distribution of high and low molecular weight compounds. Lekarstvennyj vestnik 2021; 15 (3; 83): 3–11 (In Russ.)].
10. Ярилин А.А. Основы иммунологии: учебник. М.: Медицина, 1999. 608 с. [Yarilin A.A. Fundamentals of immunology: Textbook. M.: Medicine, 1999: 608 (In Russ.)]. ISBN 5-225-02755-5.
11. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis 2011; 26: 125–132. doi: 10.1093/mutage/geq052.
12. Хахулина Н.Н., Курчатова М.Н. Микроядерный тест в оценке антимуtagenной активности лекарственных средств. Бюллетень медицинских интернет-конференций 2014 (5): 786–792 [Khakhulina N.N., Kurchatova M.N. Micronuclear test in the evaluation of antimutagenic activity of drugs. Bulletin of medical Internet conferences 2014 (5): 786–792 (In Russ.)].
13. Ларина А.С., Курчатова М.Н. Микроядерный тест в оценке антимуtagenной активности экстракта аврана лекарственного. Бюллетень медицинских интернет-конференций 2015; 4 (12): 1403–1403 [Larina A.S., Kurchatova M.N. Mikroyadernyj test v ocenke antimutagennoy aktivnosti e'kstrakta avrana lekarstvennogo. Byulleten' medicinskix Internet-konferencij 2015; 4 (12): 1403–1403 (In Russ.)].
14. Кравцов В.Ю., Федорцева Р.Ф., Старкова Е.В., Мясникова Л.В., Тюкачева М.В., Прошин С.Н., Ярцева Н.М. и др. Способ экспресс-выявления облученных пациентов с повышенными частотами хромосомных аберраций / Тип: патент на изобретение № патента: RU 2141658 С1 Патентное ведомство: Россия Год публикации: 1999, № заявки: 97120394/14. Дата регистрации: 20.11.1997. Дата публикации: 20.11.1999. Патентообладатели: Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины; Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных [Kravtsov V.Yu., Fedortseva R.F., Starkova E.V., Myasnikova L.V., Tyukacheva M.V., Proshin S.N., Yartseva N.M. et al. Method for express detection of irradiated patients with increased frequencies of chromosomal aberrations / Type: patent for invention Patent No.: RU 2141658 C1 Patent Office: Russia Publication year: 1999, Application No.: 97120394/14. Date of registration: 11/20/1997. Publication date: 11/20/1999. Patent holders: All-Russian Center for Emergency and Radiation Medicine; All-Russian Research Institute of Genetics and Farm Animal Breeding (In Russ.)].
15. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. 944 с. [Mironov A.N. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part one. Moscow: Vulture and K., 2012. 944 p (In Russ.)].
16. Гольдберг Е.Д. Справочник по гематологии. Томск: Изд-во ТГУ, 1975. 420 с. [Goldberg E.D. Handbook of Hematology. Tomsk: Publishing House of TSU, 1975. 420 p (In Russ.)].
17. Ильинских Н.Н., Васильев С., Кравцов В.Ю. Микроядерный тест в скрининге и мониторинге мутагенов LAP / Lambert Academic Publishing 12.12.2011. 524 с. [Ilyinsky N.N., Vasiliev S.S., Kravtsov V.Yu. Micronuclear test in screening and monitoring of LAP / Lambert Academic Publishing mutagens 12.12.2011. 524 p (In Russ.)].
18. Kizilian N., Wilkins R.C., Reinhardt P. et al. Biotechniques 1999; 27 (5): 926–930.
19. Томили Н.В. и др. Оценка генотоксического и цитотоксического действия известных мутагенов (этилметансульфоната,

- митомicina C и циклофосфида) с помощью микроядерного теста на лимфоцитах и ретикулоцитах крови человека и белой крысы. Клиническая токсикология 2017 (18): 90–101 [Tomilin N.V. et al. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of known mutagens (ethylmethanesulfonate, mitomycin C and cyclophosphamide) using a micronuclear test on lymphocytes and reticulocytes of human and white rat blood. Clinical toxicology 2017 (18): 90–101 (In Russ.)].
20. Ахмадуллина Ю.Р. Радиочувствительность Т-лимфоцитов периферической крови у потомков первого поколения, отцы которых подверглись хроническому радиационному воздействию. Тема диссертации и автореферата по ВАК РФ 03.01.01, кандидат наук Ахмадуллина Юлия Рафисовна 2016: 139 с. [Aхmadullina Yu.R. Radiosensitivity of peripheral blood T-lymphocytes in first-generation offspring whose fathers were exposed to chronic radiation exposure. Topic of the dissertation and abstract on the Higher Attestation Commission of the Russian Federation 03.01.01, Candidate of Sciences Aхmadullina, Yuliya Rafisovna. 2016. 139 p (In Russ.)].
 21. Дурнев А.Д. Фармакология мутагенеза. Экспериментальная и клиническая фармакология 2021; 84 (2): 8–14 [Durnev A.D. Pharmacology of mutagenesis. Experimental and clinical pharmacology 2021; 84 (2): 8–14 (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2021-84-2-8-14.
 22. Лавров А.В., Вольдгорн Я.И., Бочков Н.П. Пространственная архитектура хромосом в интерфазном ядре в норме и патологии. Вестник Российской академии медицинских наук 2011 (9): 48–54 [Lavrov A.V., Voldgorn Ya.I., Bochkov N.P. Spatial architectonics of chromosomes in the interphase nucleus in norm and pathology. Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences 2011 (9): 48–54 (In Russ.)].
 23. OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 2016. <https://doi.org/10.1787/9789264264762en> (accessed on 20 February 2020).
 24. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутантных и канцерогенных химических веществ // Всемирная организация здравоохранения. Женева, 1989: 198 [Guidelines for short-term tests for the detection of mutagenic and carcinogenic chemicals. World Health Organization. Geneva, 1989: 198 (In Russ.)].
 25. Groenink L., Verdouw P.M., Bakker B., Wever K.E. Pharmacological and methodological aspects of the separation-induced vocalization test in guinea pig pups; a systematic review and meta-analysis. Eur. J. Pharmacol. 2015; 753: 191–208. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.062
 26. Heddle J.A., Fenech M., Hayashi M., MacGregor J.T. Reflections on the development of micronucleus assays. Mutagenesis 2011; 26: 3–10. doi: 10.1093/mutage/geq085 [Cross Ref].
 27. Сексте Э.А., Айрапетов М.И., Ереско С.О. и др. Уровень мРНК рецепторов орексина второго типа (ORXR2) в условиях хронической алкоголизации в структурах мозга крыс. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2022; 20 (1): 61–66 [Sekste E.A., Ayrapetov M.I., Yeresko S.O. et al. The mRNA level of orexin type 2 receptors (ORXR2) in rat brain structures under conditions of chronic alcohol abuse. Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii 2022; 20 (1): 61–66 (In Russ.)]. doi: 10.17816/RCF20161-66.
 28. Тиссен И.Ю., Лебедев А.А., Хохлов П.П. и др. Действие орексина и его антагониста на организацию эмоционального и исследовательского поведения у крыс в модели психической травмы. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2022; 20 (1): 83–88 [Tissen I.Yu., Lebedev A.A., Hoxlov P.P. et al. The effect of orexin and its antagonist on the organization of emotional and exploratory behavior in rats in a model of psychic trauma. Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii 2022; 20 (1): 83–88 (In Russ.)]. doi: <https://doi.org/10.17816/RCF20183-8>.
 29. Le T.T., Andreadakis Z., Kumar A., Román R.G., Tollefsen S. The COVID-19 vaccine development landscape. Nature Reviews Drug Discovery 2020; 19 (5): 305–306. doi: 10.1038/d41573-020-00073-5.
 30. IIVI, INOVIO, and KNIH to partner with CEPI in a Phase I/II clinical trial of INOVIO's COVID-19 DNA vaccine in South Korea (англ.). International Vaccine Institute. 2020.

Поступила в редакцию: 08.02.2023 г.

Сведения об авторах:

Косякова Галина Павловна — кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины; 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12; e-mail: galkos1@mail.ru; ORCID 0000-0001-7211-7839;

Лебедев Андрей Андреевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией общей фармакологии отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины; 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12; e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru; ORCID 0000-0003-0297-0425; SPIN 4998-5204;

Пурвеев Сарна Саналович — аспирант отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины; 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12; e-mail: dr.purveev@gmail.com; ORCID 0000-0002-4467-2269.