

ЗАВИСИМОСТЬ ИММУНОГЕННОСТИ И РЕАКТОГЕННОСТИ КАНДИДАТНОЙ мРНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА ОТ ПОЛА ЖИВОТНЫХ И ДОЗЫ ПРЕПАРАТА

В. В. Решетников¹✉, Г. С. Шепелькова², А. В. Рыбакова³, А. П. Трашков³, В. В. Еремеев², Р. А. Иванов¹

¹ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

мРНК-вакцины показали высокую эффективность в борьбе с пандемией COVID-19 и другими вирусными инфекциями. Несмотря на интенсивное изучение мРНК-вакцин в последние пять лет, вопрос о безопасности их применения все еще остается актуальным. Целью работы было оценить иммуногенность противотуберкулезной мРНК вакцины в двух дозах у самок и самцов крыс через 2 и 4 недели после вакцинации. В эти же сроки определяли гематологические и биохимические показатели крови. Подтверждена дозозависимость иммуногенности мРНК вакцин как у самок, так и у самцов. Вакцинация привела к умеренной лимфоцитопении и нейтрофилии у самцов крыс, а также к выраженным дозо- и гендерзависимым изменениям в биохимических параметрах крови в различных временных точках. Полученные результаты свидетельствуют об умеренной токсичности противотуберкулезной мРНК вакцины и важности исследования ее токсических действий в различных временных точках у животных обоих полов.

Ключевые слова: мРНК-вакцина, туберкулез, иммуногенность, токсичность

Финансирование: исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор проекта РФ----193021X0001).

Благодарности: авторы выражают благодарность сотрудникам АНО ВО «Университет «Сириус» И. М. Теренину за постановку транскрипции *in vitro*, О. В. Заборовой — за формуляцию мРНК в липидные наночастицы.

Вклад авторов: В. В. Решетников — подготовка мРНК вакцины, планирование эксперимента, написание рукописи; Г. С. Шепелькова — постановка экспериментов, анализ результатов; А. В. Рыбакова — постановка экспериментов, анализ результатов; А. П. Трашков — планирование эксперимента, редактирование рукописи; В. В. Еремеев — планирование эксперимента, редактирование рукописи; Р. А. Иванов — планирование эксперимента, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № 2 от 31 октября 2023 г.), проведено в соответствии с Приказом Минздрава № 755 и Руководством Управления по охране лабораторных животных А5502-01.

✉ **Для корреспонденции:** Василий Владимирович Решетников
Олимпийский пр-т, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 16.09.2024 **Статья принята к печати:** 04.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.045

THE CANDIDATE ANTI-TUBERCULOSIS mRNA VACCINE IMMUNOGENICITY AND REACTOGENICITY DEPENDENCY ON THE ANIMAL'S SEX AND THE VACCINE DOSE

Reshetnikov VV¹✉, Shepelkova GS², Rybakova AV³, Trashkov AP³, Yermeev VV², Ivanov RA¹

¹ Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia

² Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

³ National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

mRNA vaccines turned out to be highly effective in combating the COVID-19 pandemic and other viral infections. Despite extensive study of mRNA vaccines in the last five years, the issue of safety of their use is still relevant. The study aimed to assess immunogenicity of two anti-tuberculosis mRNA vaccine doses in female and male rats 2 and 4 weeks after vaccination. Hematological and biochemical parameters of blood were determined within the same timeframe. The dose-dependent nature of mRNA vaccine immunogenicity was confirmed in both females and males. Vaccination led to moderate lymphopenia and neutrophilia in male rats, as well as to apparent dose-dependent and sex-related changes in blood biochemistry parameters at various time points. The findings suggest moderate toxicity of the anti-tuberculosis mRNA vaccine and the importance of assessing its toxic effects at various time points in animals of both sexes.

Keywords: mRNA vaccine, tuberculosis, immunogenicity, toxicity

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-10-2021-113, project ID RF----193021X0001).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to staff members of the Sirius University of Science and Technology: I. M. Terenin for *in vitro* transcription, O. V. Zaborova for formulation of mRNA into lipid nanoparticles.

Author contribution: Reshetnikov VV — mRNA vaccine preparation, experimental procedure, manuscript writing; Shepelkova GS — experimental procedure, data analysis; Rybakova AV — experimental procedure, data analysis; Trashkov AP — planning the experiment, manuscript editing; Yermeev VV — planning the experiment, manuscript editing; Ivanov RA — planning the experiment, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Research Centre "Kurchatov Institute" (protocol No. 2 dated 31 October 2023) and conducted in accordance with the Order of the Ministry of Health No. 755 and the Guidelines issued by the Office of Laboratory Animal Welfare (A5502-01).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vasily V. Reshetnikov
Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Received: 16.09.2024 **Accepted:** 04.10.2024 **Published online:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.045

В настоящее время активно ведется разработка новых мРНК-вакцин против различных вирусных и бактериальных инфекций, в том числе туберкулеза, для которых ранее разработанные живые, аттенуированные, рекомбинантные и ДНК-вакцины не показали приемлемой эффективности [1, 2]. Тем не менее существует много пробелов в нашем понимании биологии мРНК-вакцин, доставляемых с помощью липидных наночастиц (ЛНЧ). Известно, что мРНК-ЛНЧ имеют широкое биораспределение, обнаруживаются в большинстве тканей [3, 4], приводят к воспалительному ответу в месте введения и могут быть ассоциированы с нейровоспалением [5]. Накопилось немало свидетельств того, что применение вакцин на основе мРНК в некоторых случаях ассоциировано с развитием аллергических реакций, миокардитов и легочных кровотечений [6]. Вакцинирование мРНК-ЛНЧ в некоторых случаях приводит к отложенным во времени транскриптомным изменениям и умеренным изменениям уровня метилирования CpG-островков в периферических моноцитах крови [7]. Кроме того, сведений о биораспределении, а также времени элиминации мРНК вакцин и кодируемых ими антигенов недостаточно [4].

В доклинических испытаниях мРНК вакцин RNA-1273 и BNT162b2 против COVID-19 на крысах в первые сутки после вакцинации были показаны умеренное снижение массы и повышение температуры тела животных. Были выявлены также провоспалительные гематологические и биохимические изменения, повышение уровня цитокинов [8, 9]. Макроскопические изменения включали увеличение массы селезенки, печени и надпочечников, микроскопические — умеренное воспаление в месте инъекции, в паховой области, в подвздошных и подколечных лимфатических узлах, а также признаки воспаления в печени и селезенке. Все изменения носили дозозависимый характер, большинство показателей вернулось в состояние нормы через 2–3 недели после введения последней дозы препарата [8, 9]. Клинические исследования мРНК-вакцин RNA-1273, BNT162b2 и CS-2034 [10–12] тоже показали дозозависимые, местнораздражающие и системные нежелательные эффекты у некоторых участников, которые включали в себя воспаление в месте введения, усталость, головную боль, озноб, мышечную боль и боль в суставах, гематологические и биохимические изменения параметров крови. Нежелательные эффекты мРНК препаратов могут быть связаны как с действующим веществом вакцины — молекулой мРНК, так и с кодируемыми ею антигенами или липидными наночастицами, в которых инкапсулирована РНК.

Ранее мы показали, что разработанная нами противотуберкулезная мРНК-вакцина приводит к формированию адаптивного и протективного иммунного ответа [13]. Однако безопасность ее использования оставалась невыясненной. Цель данной работы — оценить токсическое действие двукратного введения противотуберкулезной мРНК-вакцины по изменению гематологических и биохимических параметров крови у самцов и самок крыс через 2 и 4 недели после вакцинации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В эксперименте использовали 30 самок (126–149 г) и 30 самцов (154–180 г) крыс Wistar SPF-статуса возрастом 8–12 недель. Исследования проводили на базе питомника НИЦ Курчатowski институт, животных содержали в

SPF-условиях при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч и доступом к корму и воде *ad libitum*.

Дизайн эксперимента

Для работы было сформировано три экспериментальные группы, в каждой из них по 10 самцов и 10 самок:

группа I: группа с введением мРНК вакцины МТВ-мEr5-1 в дозе 5 мкг/животное;

группа II: группа с введением мРНК вакцины МТВ-мEr5-1 в дозе 15 мкг/животное;

группа III: группа с введением фосфатного буфера (PBS). мРНК-вакцину или фосфатный буфер вводили экспериментальным животным двукратно с интервалом в 14 дней внутримышечно в область бедра с помощью трехкомпонентного инсулинового шприца с диаметром иглы 26 G в объеме 200 мкл (рис. 1А). Животные были подвергнуты эвтаназии наркотизацией тилетамин/золазепамом и ксилазином в дозах 15 мг/кг и 6 мг/кг соответственно, с последующим обескровливанием полостей сердца и забором селезенки и паховых лимфоузлов. По пять самцов и пять самок из каждой группы были умерщвлены на 16-й день эксперимента (через 24 ч после повторного введения препарата), остальные животные — на 29-й день (через две недели после повторного введения препарата). У всех животных после умерщвления из полостей сердца была забрана кровь для клинического и биохимического анализа. Кроме того, для оценки иммуногенности мРНК вакцин были забраны паховые лимфоузлы и селезенка.

Используемые дозы мРНК вакцин соотносятся с дозой мРНК вакцины CVnCoV против COVID-19, которая в настоящее время проходит клинические испытания [NCT04652102]. МТВ-мEr5-1 — вакцина с немодифицированным нуклеотидным составом (без использования аналогов уридина). Доза мРНК вакцины CVnCoV соответствует 12 мкг. Выбранные нами дозы исследуемой кандидатной вакцины — 5 и 15 мкг — являются близкими к дозам, используемым в клиническом исследовании, но без поправки на вес животного.

Вакцина МТВ-мEr5-1

Мультиэпитопная мРНК вакцина МТВ-мEr5-1 соответствует вакцине 5'-TPL-mEpiTope-mRNA1273-3', описанной ранее с незначительными модификациями [13]. В процессе *in vitro* транскрипции в качестве аналога кэпа был использован m7G(3'OMe)pppA(2'OMe)pG («Биолабмикс»; Россия) в концентрации 2,4 мм. Для специфической встройки этого аналога кэпа в процессе котранскрипционного экпирования после последовательности T7 промотора в последовательность ДНК плазмиды был добавлен один аденин. Последовательность мРНК МТВ-мEr5-1 представлена в Приложении 1.

Остальные описанные ранее [13] этапы наработки мРНК вакцинного препарата оставались без изменения. Формуляцию мРНК в липидные наночастицы осуществляли с помощью микрофлюидного картриджа на приборе NanoAssemblr™ Benchtop (Precision NanoSystems Inc; Канада). Частицы были сконцентрированы и стерилизованы с помощью PES-мембраны с диаметром пор 0,22 мкм. До момента введения препарата липидные наночастицы хранили при +4 °C не более 3 недель.

Аналитическую характеристику полученных частиц проводили, как описано ранее [13], она включала оценку

их размера, индекса полидисперсности, дзета-потенциала, процента загрузки мРНК в частицы и ее целостности. Размер частиц во всех экспериментальных группах был в диапазоне 86–88 нм, дзета-потенциал — в диапазоне от –3 до –2 мВ, индекс полидисперсности не превышал 0,1. Уровень загрузки РНК был более 90%, целостность РНК согласно данным капиллярного электрофореза — более 85%.

Гематологический и биохимический анализ крови

Для гематологических исследований кровь была собрана из полостей сердца в пробирки с антикоагулянтом (КЗ-ЭДТА), исследование проводили на гематологическом анализаторе DIATRON Abacus Junior 22.5. В образцах цельной крови определяли количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов и лейкоцитарную формулу.

Для биохимического анализа крови образцы были забраны в пробирки с разделительным гелем, центрифугированы для получения сыворотки при 3000 г. В сыворотке была определена концентрация аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), мочевины, щелочной фосфатазы, общего билирубина, общего белка, глюкозы на биохимическом анализаторе Architect c8000 (Abbott, США).

Определение количества IFN γ -продуцирующих клеток

Уровень протективного Т-клеточного иммунного ответа оценивали по количеству выделенных из селезенки и паховых лимфоузлов клеток, секретирующих IFN γ в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами (соникат *M. tuberculosis*) (10 мкг/мл) или рекомбинантным белком ESAT6 в концентрации 10 мкг/мл (методика получения ESAT6 описана ранее [14]) методом ELISPOT при помощи наборов Mouse IFN γ ELISpot Set (BD; США) и AEC Substrate Set (BD; США) в соответствии с рекомендациями изготовителей.

Статистический анализ данных

Все данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk's W test). Были рассчитаны медиана и квартильный размах (Q_{25} – Q_{75}); межгрупповые сравнения (post hoc analysis) проведены с использованием критерия Тьюки (Tukey's test analysis). Для комплексной оценки данных независимых групп в контрольных точках исследования был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Статистическую значимость определяли при $p < 0,05$. Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка иммуногенности

Мы оценили влияние дозы вакцины на формирование адаптивного иммунного ответа у самок и самцов крыс в двух временных точках. Обнаружено значимое влияние иммунизации на уровень IFN γ -продуцирующих клеток (ИПК) после специфической стимуляции как в селезенке, так и в паховом лимфоузле (рис. 1Б). Однако количество ИПК в селезенке было значительно выше. Мы также наблюдали выраженные различия в уровне ИПК на лунку в зависимости от типа специфической стимуляции (белок

ESAT6 или соникат *M. tb*) как для клеток лимфоузла, так и для клеток селезенки в обеих временных точках. По всей вероятности, эти эффекты объясняются различной концентрацией целевого антигена в препарате, используемом для специфической стимуляции.

Оценка динамики формирования адаптивного иммунного ответа показала, что более выраженный ответ происходит на 29-й день эксперимента, через две недели после второй вакцинации, что хорошо согласуется с литературными данными.

Дозозависимые эффекты наблюдались после стимуляции ESAT6: на 16-й день эксперимента в клетках лимфоузлов уровень ИПК в группе I с введением дозы 5 мкг был выше, чем в группе II, и на 29-й день эксперимента в клетках селезенки уровень ИПК был почти в 2 раза выше у группы II по сравнению с группой I. Значимых различий в степени выраженности адаптивного иммунного ответа между самцами и самками не наблюдалось ($p > 0,05$).

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что двукратное внутримышечное введение мРНК-вакцины МТВ-мEr5-1 крысам приводит к формированию адаптивного иммунного ответа, который детектируется в двух исследуемых временных точках, и степень его выраженности зависит от дозы, но не от пола животного.

Оценка гематологических и биохимических изменений в крови

Мы не обнаружили существенного влияния вакцинации на показатели изучаемых параметров крови экспериментальных животных. Значимых изменений у самок всех экспериментальных групп в двух временных точках не наблюдалось (табл. 1). Лишь у самцов, иммунизированных вакциной МТВ-мEr5-1 в дозе 15 мкг, на 16-е сутки исследования отмечалось значимое снижение медианных значений абсолютного ($1,97 \times 10^9/\text{л}$ против $3,78 \times 10^9/\text{л}$ в группе PBS) и относительного уровня лимфоцитов (лимфоцитопения) и повышение медианных значений абсолютного ($2,64 \times 10^9/\text{л}$ против $0,89 \times 10^9/\text{л}$ в группе PBS) и относительного уровня нейтрофилов (нейтрофилия). Однако эти параметры пришли в норму через две недели после второго введения вакцины, на 29-й день эксперимента.

При анализе основных биохимических показателей крови у получавших тестируемый препарат экспериментальных животных на 16-е и 29-е сутки исследования отмечались существенные изменения показателей результатов биохимического анализа. У самок крыс на 16-й день эксперимента вакцинация оказала влияние на уровень АЛТ, АСТ и общий белок в крови (ANOVA: $F(2,12) = 4,03$, $p = 0,046$; $F(2,12) = 8,58$, $p = 0,005$; $F(2,12) = 9,05$, $p = 0,004$ соответственно). Самки, иммунизированные МТВ-мEr5-1 в дозе 15 мкг, демонстрировали повышение уровня АЛТ и АСТ и снижение уровня общего белка в крови. Самки, иммунизированные МТВ-мEr5-1 в дозе 5 мкг, демонстрировали только повышение уровня АСТ. В то же время у самцов подобных изменений в биохимических показателях крови обнаружено не было.

На 29-й день эксперимента, изменения большинства биохимических параметров у самок крыс экспериментальных групп было нивелировано, за исключением АЛТ [ANOVA: $F(2,12) = 14,12$, $p = 0,001$], который оставался повышенным в группе МТВ-мEr5-1 15 мкг. Напротив, у самцов на 29-й день эксперимента вакцинация привела к изменению большинства биохимических параметров крови, АЛТ

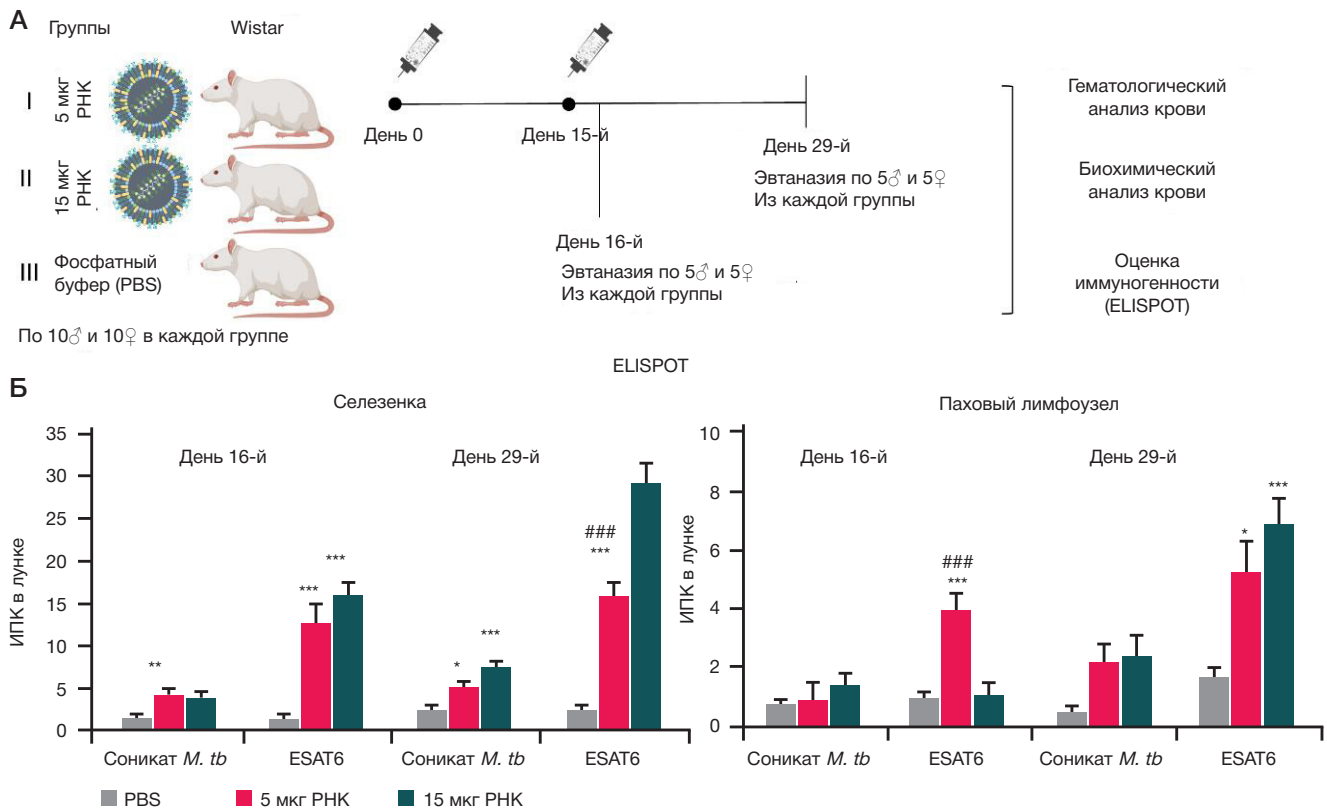


Рис. 1. Оценка иммуногенности мРНК вакцины. **А.** Экспериментальный дизайн. **Б.** Данные анализа ELISPOT на клетках селезенки и паховых лимфоузлов. ИПК — IFN γ -продуцирующие клетки. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей контрольной группой (PBS); ### — $p < 0,001$ по сравнению с группой 15 мкг РНК

($F(2,12) = 7,65, p = 0,007$], АСТ ($F(2,12) = 8,13, p = 0,006$), мочевины ($F(2,12) = 6,5, p = 0,012$) и уровень общего белка ($F(2,12) = 5,2, p = 0,024$). Наши результаты показывают, что уровни мочевины, АЛТ и АСТ были повышены в обеих экспериментальных группах, вне зависимости от дозы мРНК-вакцины. В то же время на повышение и снижение уровня общего белка у экспериментальных групп выраженное влияние оказывала доза вводимой мРНК-вакцины.

Таким образом, иммунизация мРНК-вакциной МТВ-мEr5-1 привела к выраженным зависимым от пола животных и дозы вакцины изменениям биохимических параметров крови в разных временных точках у самок и самцов крыс. В то же время влияние вакцинации МТВ-мEr5-1 на гематологические параметры крови было умеренным (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вакцинация зачастую приводит к побочным реакциям воспалительного генеза, которые могут включать боль в месте инъекции, покраснение или отек, а также системные симптомы, такие как повышение температуры тела и изменение клеточного состава крови [15]. мРНК-вакцины обладают иммуностимулирующими свойствами как за счет самой молекулы РНК, так и за счет компонентов липидных наночастиц [16]. Попадая в клетку, РНК может распознаваться внутриклеточными рецепторами, включая толл-подобные рецепторы 3 и 7, что приводит к активации сигнальных путей врожденного иммунитета [16, 17].

Мы показали, что через сутки после второго введения наибольшей дозы вакцинного препарата у самцов крыс наблюдается лимфоцитопения и нейтрофилия, которые нивелируются через две недели после введения мРНК-вакцины. Эти данные хорошо согласуются с результатами

доклинических исследований других мРНК-вакцинных препаратов, таких как RNA-1273, BNT162b2 [8, 9], в которых также в первые сутки после введения наблюдалось повышение уровня цитокинов в крови, увеличение количества лейкоцитов, нейтрофилов и эозинофилов, снижение лимфоцитов. Известно, что умеренный воспалительный ответ необходим для формирования адаптивного иммунитета. В недавнем исследовании [18] было также показано, что более выраженные воспалительные ответы на введение вакцины коррелируют с формированием более сильного адаптивного иммунного ответа. В нашем исследовании введение повышенной дозы (15 мкг) вакцины помимо изменения клеточного состава крови приводило к более выраженному адаптивному иммунному ответу.

В отличие от краткосрочных изменений гематологических параметров биохимические изменения, ассоциированные с воспалением, были более стабильными. По нашим данным, даже через 2 недели после второго введения препарата у самок был повышен уровень АЛТ, а у самцов были повышены АЛТ, АСТ, мочевины и снижен уровень общего белка. Изменения этих биохимических параметров могут быть связаны с нарушениями в работе печени и почек. Мы провели гистологический анализ органов животных (данные не представлены) и обнаружили микроскопические признаки воспаления в печени (дозозависимое нарастание признаков продуктивного васкулита: утолщение стенок сосудов, инфильтрация лимфоцитами, очаговые скопления лимфоцитов и макрофагов). В то же время в почках микроскопических признаков воспаления найдено не было.

Биохимические изменения в крови и микроскопические изменения печени были зарегистрированы также в доклинических исследованиях мРНК-вакцин, проведенных компаниями BioNTech и Moderna [8, 9]. В этих исследованиях

Таблица 1. Гематологические показатели крови

Группа	Пол	WBC 10 ⁹ /л	Neu%	Lym%	Mon%	Eos%	Bas%	RBC 10 ¹² /л	HGB г/л	HCT	PLT 1012/л	
16-й день исследования												
Физиологический раствор (PBS)	♂	Медиана	5,86	24,9	67,9	5,9	1,1	0,1	6,3	146	38,4	684
		Q25-Q75	5,74-5,87	24 25,4	67,5-68,9	4,6-6,5	1-1,5	0,1-0,1	6,1-6,4	144-146	38,2-38,4	678-936
	♀	Медиана	4,06	21,1	72,5	4,6	2	0,1	6,03	137	36,7	1197
		Q25-Q75	3,67-4,45	20,0-21,6	71,7-72,5	3,9-4,6	1,1-2,6	0,00-0,10	5,99-6,33	135-144	36,5-38,9	925-1311
MTB-mEp5-1 5 мкг	♂	Медиана	5,78	33,6	57,6	6,3	1,4	0,2	6	137	36,3	1054
		Q25-Q75	5,55-6,44	29,4-34,5	55,9-63,6	5,7-6,3	1,3-1,4	0,1-0,2	5,9-6,1	136-137	35,9-37,2	987-1079
	♀	Медиана	5,01	32,3	59,5	6,4	1,4	0,1	6,1	138	37,2	990
		Q25-Q75	4,6-5,63	28,4-37,4	54,5-68,0	4,3-6,5	1,2-1,5	0,10-0,20	5,99-6,20	138-139	37,1-38,1	951-1011
MTB-mEp5-1 15 мкг	♂	Медиана	4,69	51,1*	38,8*	7,3	1,5	0,2	5,9	132	35	978
		Q25-Q75	3,67-6,19	48,6-54,9	38-42,4	5,6-8,7	1,3-1,6	0,1-0,2	5,8-6,0	131 134	34,2-35,3	908-985
	♀	Медиана	3,51	31,1	64	4,6	1,7	0,1	6,07	139	38	867
		Q25-Q75	2,87-4,29	26,4-35,7	56,3-66,6	3,9-4,8	1,6-2,1	0,10-0,10	6,07-6,21	139-145	37,5-38,2	845-906
29-й день исследования												
Физиологический раствор (PBS)	♂	Медиана	5,7	42,2	51	5,1	1,5	0,1	6,39	143	36,5	780
		Q25-Q75	5,63-6,03	37,3-44,1	48,9-56,5	4,6-5,6	1,2-1,6	0,00-0,10	6,34-6,45	141-147	35,7-36,7	774-850
	♀	Медиана	3,39	31,3	61,3	5,1	1,7	0,1	6,38	139	36,4	734
		Q25-Q75	3,02-3,44	30,8-32,7	60,7-61,3	4,5-5,3	1,4-2	0,1-0,2	6,16-6,44	139-141	36,2-36,5	696-781
MTB-mEp5-1 5 мкг	♂	Медиана	6,38	25	69,6	4,2	1,2	0,1	6,58	142	37,5	738
		Q25-Q75	6,13-7,56	24,8-25,5	65,2-69,7	4,1-5,3	1,1-1,3	0-0,1	6,45-6,92	142-148	37-40,4	711-796
	♀	Медиана	4,1	22,9	70,7	4,5	1,4	0,1	6,91	156	39,9	780
		Q25-Q75	3,88-4,71	22,7-25,4	69,5-71,7	4-4,8	1,2-1,6	0,1-0,2	6,76-7,01	151-156	39,3-40,3	737-852
MTB-mEp5-1 15 мкг	♂	Медиана	6,9	26,2	66,1	5	1,1	0,1	6,53	145	36,8	797
		Q25-Q75	6,19-7,41	25,9-27,6	65,5-67,4	4,6-5,8	0,9-1,3	0,1-0,2	6,42-6,66	143-149	36,6-38,1	791-845
	♀	Медиана	5,05	23,1	72,6	4,2	1	0,1	6,18	135	35,2	834
		Q25-Q75	4,41-6,49	22,1-24,9	69-74,2	1,7-4,6	0,9-1,1	0-0,1	6,15-6,19	135-136	34,9-35,6	782-922

Примечание: данные представлены в виде медианы и квартильного размаха (Q25-Q75). Данные по абсолютным значениям лимфоцитов и нейтрофилов не приведены, но статистическая достоверность между группами повторяется и при сравнении абсолютных значений. * — отличие от контрольных значений достоверно на принятом уровне значимости ($p < 0,05$). WBC (white blood cells) — белые кровяные тельца; Neu% — относительное содержание нейтрофилов; Lym% — относительное содержание лимфоцитов; Mon% — относительное содержание моноцитов; Eos% — относительное содержание эозинофилов; Bas% — относительное содержание базофилов; RBC (red blood cells) — абсолютное содержание эритроцитов; HGB (hemoglobin) — концентрация гемоглобина; HCT (hematocrit) — гематокрит; PLT (platelets) — абсолютное содержание тромбоцитов.

у части животных также отмечались повышение уровня АСТ, мочевины, щелочной фосфатазы, триглицеридов, холестерина, билирубина и снижение уровня общего белка. Эти изменения сопровождались структурными изменениями в печени, которые заключались в увеличении массы органа, гепатоцитарной вакуолизации, гипертрофии клеток Купфера, единичных некрозах клеток или дегенерации гепатоцитов. Однако авторы не уточняют в доклиническом отчете, через какой период времени биохимические и гистологические показатели приходят в норму после вакцинации.

В доклиническом исследовании мРНК вакцины BNT162b2 авторы предполагают, что вакуолизация клеток печени может быть связана со специфическим накоплением ионизируемых липидов ALC-0315 [9]. Другие липидные компоненты, такие как SM102, ALC-0159 или PEG2000-DMG, также могут обладать токсичностью в больших дозах, однако используемые дозы в вакцине значительно меньше и предположительно не должны оказывать токсичных воздействий [8, 9, 19].

В нашей работе также были использованы липиды ALC-0315, SM-102, которые, как уже отмечалось, способны активировать врожденный иммунный ответ [16]. Значимым отличием нашей вакцины MTB-mEp5-1 от вакцин RNA-1273 и BNT162b2 является использование в последовательности РНК немодифицированного уридина. Последний является

сильным стимулятором врожденного иммунитета в отличие от N1-метилпсевдоуридина, который был использован в вакцинах RNA-1273 и BNT162b2 [16, 17].

По всей вероятности, чрезмерная активация врожденного иммунитета как за счет немодифицированной РНК, так и за счет липидных компонентов может привести к более выраженному и продолжительному воспалительному процессу. Следует отметить, что чрезмерная иммунная активация может вызывать повреждение ткани печени и сопровождаться изменением биохимических параметров крови. Однако подобные случаи встречаются крайне редко (один на 14 млн случаев) при использовании различных вакцин, в том числе RNA-1273 и BNT162b2, и связаны с развитием аутоиммунных процессов [20].

Особого внимания заслуживают различия в выраженности влияния вакцинации MTB-mEp5-1 на биохимические параметры крови у самок и самцов. Наши результаты показывают, что через сутки после бустерной дозы мРНК вакцины различия в биохимических параметрах крови детектировались только у самок. В то же время через две недели после второй вакцинации более выраженные изменения детектировались у самцов. Эти различия могут быть обусловлены как различиями физиологических концентраций вакцины, связанными с весом животных (вес самцов был на 15–20% больше), так и другими физиологическими особенностями (уровень

Таблица 2. Биохимические показатели крови

Группа	Пол	Оцениваемые показатели						
		АЛТ, ЕД/л	АСТ, ЕД/л	Мочевина, мм/л	Щелочная фосфатаза, ЕД/л	Общий билирубин, мкМ/л	Общий белок, г/л	Глюкоза, мм/л
16-й день исследования								
Физиологический раствор (PBS)	♂	78; 66–80	72; 69–94	4,6; 4,3–5,1	353; 339–362	18,9; 16,6–21,1	59; 58–62	4,9; 4,8–5,0
	♀	73; 71–90	66; 64–73	5,0; 4,8–5,3	382; 350–402	17,1; 15,5–20,3	61; 59–66	4,7; 4,7–5,0
МТВ-мЕр5-1 5 мкг	♂	78; 75–101	82; 70–92	4,8; 4,1–5,2	381; 377–420	18,0; 16,6–19,4	54; 51–59	5,0; 4,9–5,2
	♀	82; 70–96	92*; 65–95	4,4; 4,4–4,7	390; 382–408	18,0; 15,2–18,4	57; 55–59	4,3; 4,1–4,5
МТВ-мЕр5-1 15 мкг	♂	99; 81–114	98; 87–110	4,9; 4,9–4,9	364; 361–400	18,8; 17,2–20,0	53; 51–54	4,6; 4,2–4,8
	♀	104*; 93–110	106*; 101–111	5,1; 4,0–5,2	401; 385–414	18,0; 16,2–18,9	50*; 49–52	4,3; 4,3–4,5
29-й день исследования								
Физиологический раствор (PBS)	♂	73; 69–77	78; 71–80	4,2; 4,2–4,5	370; 364–402	19,5; 17,5–19,5	57; 55–60	5,0; 4,8–5,1
	♀	77; 75–78	83; 75–83	4,8; 4,5–4,9	361; 351–380	18,3; 18,2–19,1	56; 54–57	5,0; 5,0–5,3
МТВ-мЕр5-1 5 мкг	♂	85*; 80–88	96*; 90–97	5,2*; 5,0–5,4	401; 400–414	20,4; 19,2–20,5	55; 53–55	5,1; 4,9–5,5
	♀	82; 82–90	90; 83–101	5,2; 4,4–5,3	388; 383–397	20,1; 19,0–21,0	52; 50–53	4,3; 4,2–4,7
МТВ-мЕр5-1 15 мкг	♂	99*; 92–101	101*; 93–107	5,3*; 5,1–5,6	387; 385–410	20,0; 18,3–20,6	52*; 50–52	5,0; 4,1–5,0
	♀	105*; 96–110	102; 97–114	5,2; 4,8–5,5	415; 402–416	20,9; 19,7–21,1	50; 50–52	4,9; 4,8–5,2

Примечание: данные представлены в виде медианы и квартильного размаха (Q_{25} – Q_{75}). * — отличие от контрольных значений достоверно при принятом уровне значимости ($p < 0,05$).

половых гормонов), генетическими различиями (включая экспрессию X-сцепленных генов) [21]. Различия в уровне половых стероидных гормонов оказывают влияние на функционирование иммунных клеток, что приводит к различиям в активности иммунного ответа [21]. В частности, результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что у женщин наблюдается более высокий уровень выработки антител и более выраженный клеточный ответ после вакцинации [21, 22]. Вакцинация мРНК- или другими вакцинами приводит у женщин к более частым побочным эффектам, таким как повышение температуры тела, боль и местное воспаление [22, 23]. Таким образом, литературные данные о гендерспецифичных эффектах вакцинации согласуются с нашими результатами, которые показывают, что введение МТВ-мЕр5-1 вызывает у самок

более быстрые изменения в биохимических параметрах крови. Эти изменения, по всей видимости, связаны с более высокой иммунореактивностью самок крыс на компоненты мРНК-вакцины.

Выводы

Результаты нашего исследования свидетельствуют о высокой реактогенности вакцины МТВ-мЕр5-1 на основе немодифицированной РНК. Признаки воспаления в исследованных органах и устойчивое изменение показателей биохимического анализа крови животных являются основанием для расширенного изучения безопасности и механизмов специфической фармакологической активности тестируемого препарата.

Литература

- Matarazzo L, Bettencourt PJG. mRNA vaccines: a new opportunity for malaria, tuberculosis and HIV. *Front Immunol.* 2023;14: 1172691.
- Kazakova A, Zhelnov P, Sidorov R, Rogova A, Vasileva O, et al. DNA and RNA vaccines against tuberculosis: a scoping review of human and animal studies *Frontiers in Immunology.* 2024; 15.
- Ndeupen S, Qin Z, Jacobsen S, Bouteau A, Estanbouli H, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021; 24: 103479.
- Pateev I, Seregina K, Ivanov R, Reshetnikov V. Biodistribution of RNA Vaccines and of Their Products: Evidence from Human and Animal Studies. *Biomedicine.* 2023; 12.
- Kirshina AKA, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, Muslimov A, Reshetnikov V. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
- van den Ouweland F, Charpentier N, Tureci O, Rizzi R, Mensa FJ, et al. Safety and reactogenicity of the BNT162b2 COVID-19 vaccine: Development, post-marketing surveillance, and real-world data. *Hum Vaccin Immunother.* 2024; 20: 2315659.
- Pang APS, Higgins-Chen AT, Comite F, Raica I, Arboleda C, et

- al. Longitudinal Study of DNA Methylation and Epigenetic Clocks Prior to and Following Test-Confirmed COVID-19 and mRNA Vaccination. *Front Genet.* 2022; 13: 819749.
8. European Medicines Agency. Moderna Assessment Report COVID-19 Vaccine Moderna. 2021.
 9. European Medicines Agency. Assessment report: Comirnaty. 2021.
 10. Jin Z, Wu J, Wang Y, Huang T, Zhao K, et al. Safety and immunogenicity of the COVID-19 mRNA vaccine CS-2034: A randomized, double-blind, dose-exploration, placebo-controlled multicenter Phase I clinical trial in healthy Chinese adults. *J Infect.* 2023; 87: 556–70.
 11. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1920–31.
 12. Walsh EE, Frenck RW, Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med.* 2020; 383: 2439–50.
 13. Reshetnikov V, Terenin I, Shepelkova G, Yermeev V, Kolmykov S, et al. Untranslated Region Sequences and the Efficacy of mRNA Vaccines against Tuberculosis. *Int J Mol Sci.* 2024; 25.
 14. Vasileva O, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, Rybtsov S, et al. Immunogenicity of full-length and multi-epitope mRNA vaccines for M. Tuberculosis as demonstrated by the intensity of T-cell response: a comparative study in mice. *Bulletin of RSMU.* 2023; 03: 42–48.
 15. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol.* 2021; 21: 195–7.
 16. Verbeke R, Hogan MJ, Lore K, Pardi N. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity.* 2022; 55: 1993–2005.
 17. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, et al. The Dual Role of the Innate Immune System in the Effectiveness of mRNA Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023; 24.
 18. Zhuang CL, Lin ZJ, Bi ZF, Qiu LX, Hu FF, et al. Inflammation-related adverse reactions following vaccination potentially indicate a stronger immune response. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10: 365–75.
 19. Kang DD, Hou X, Wang L, Xue Y, Li H, et al. Engineering LNPs with polysarcosine lipids for mRNA delivery. *Bioact Mater.* 2024; 37: 86–93.
 20. Schinas G, Polyzoou E, Dimakopoulou V, Tsoupra S, Gogos C, et al. Immune-mediated liver injury following COVID-19 vaccination. *World J Virol.* 2023; 12: 100–8.
 21. Flanagan KL, Fink AL, Plebanski M, Klein SL. Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017; 33: 577–99.
 22. Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 338–49.
 23. Bignucolo A, Scarabel L, Mezzalana S, Polesel J, Cecchin E, et al. Sex Disparities in Efficacy in COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines (Basel).* 2021; 9.

References

1. Matarazzo L, Bettencourt PJG. mRNA vaccines: a new opportunity for malaria, tuberculosis and HIV. *Front Immunol.* 2023;14: 1172691.
2. Kazakova A, Zhelnov P, Sidorov R, Rogova A, Vasileva O, et al. DNA and RNA vaccines against tuberculosis: a scoping review of human and animal studies *Frontiers in Immunology.* 2024; 15.
3. Ndeupen S, Qin Z, Jacobsen S, Bouteau A, Estantouli H, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021; 24: 103479.
4. Pateev I, Seregina K, Ivanov R, Reshetnikov V. Biodistribution of RNA Vaccines and of Their Products: Evidence from Human and Animal Studies. *Biomedicines.* 2023; 12.
5. Kirshina AKA, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, Muslimov A, Reshetnikov V. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
6. van den Ouweland F, Charpentier N, Tureci O, Rizzi R, Mensa FJ, et al. Safety and reactogenicity of the BNT162b2 COVID-19 vaccine: Development, post-marketing surveillance, and real-world data. *Hum Vaccin Immunother.* 2024; 20: 2315659.
7. Pang APS, Higgins-Chen AT, Comite F, Raica I, Arboleda C, et al. Longitudinal Study of DNA Methylation and Epigenetic Clocks Prior to and Following Test-Confirmed COVID-19 and mRNA Vaccination. *Front Genet.* 2022; 13: 819749.
8. European Medicines Agency. Moderna Assessment Report COVID-19 Vaccine Moderna. 2021.
9. European Medicines Agency. Assessment report: Comirnaty. 2021.
10. Jin Z, Wu J, Wang Y, Huang T, Zhao K, et al. Safety and immunogenicity of the COVID-19 mRNA vaccine CS-2034: A randomized, double-blind, dose-exploration, placebo-controlled multicenter Phase I clinical trial in healthy Chinese adults. *J Infect.* 2023; 87: 556–70.
11. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1920–31.
12. Walsh EE, Frenck RW, Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med.* 2020; 383: 2439–50.
13. Reshetnikov V, Terenin I, Shepelkova G, Yermeev V, Kolmykov S, et al. Untranslated Region Sequences and the Efficacy of mRNA Vaccines against Tuberculosis. *Int J Mol Sci.* 2024; 25.
14. Vasileva O, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, Rybtsov S, et al. Immunogenicity of full-length and multi-epitope mRNA vaccines for M. Tuberculosis as demonstrated by the intensity of T-cell response: a comparative study in mice. *Bulletin of RSMU.* 2023; 03: 42–48.
15. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol.* 2021; 21: 195–7.
16. Verbeke R, Hogan MJ, Lore K, Pardi N. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity.* 2022; 55: 1993–2005.
17. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, et al. The Dual Role of the Innate Immune System in the Effectiveness of mRNA Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023; 24.
18. Zhuang CL, Lin ZJ, Bi ZF, Qiu LX, Hu FF, et al. Inflammation-related adverse reactions following vaccination potentially indicate a stronger immune response. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10: 365–75.
19. Kang DD, Hou X, Wang L, Xue Y, Li H, et al. Engineering LNPs with polysarcosine lipids for mRNA delivery. *Bioact Mater.* 2024; 37: 86–93.
20. Schinas G, Polyzoou E, Dimakopoulou V, Tsoupra S, Gogos C, et al. Immune-mediated liver injury following COVID-19 vaccination. *World J Virol.* 2023; 12: 100–8.
21. Flanagan KL, Fink AL, Plebanski M, Klein SL. Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017; 33: 577–99.
22. Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 338–49.
23. Bignucolo A, Scarabel L, Mezzalana S, Polesel J, Cecchin E, et al. Sex Disparities in Efficacy in COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines (Basel).* 2021; 9.