



## СРАВНЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИНЫ «ГАМ-КОВИД-ВАК» ПРИ ВНУТРИМЫШЕЧНОМ И ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ПУТЯХ ВВЕДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Е.И. Каторкина, И.В. Лягоскин, Е.Н. Бочарова, М.В. Болотникова, А.А. Борзов,  
Н.В. Бельская\*, А.Е. Лисова, К.В. Ульянова, Н.К. Кудина, Н.А. Белянина,  
О.М. Стрижакова, А.С. Першин, Я.А. Бахарева, П.Е. Каргополова, А.П. Васильев,  
А.А. Казаров, М.В. Лыков, Р.А. Хамитов

АО «ГЕНЕРИУМ»  
601125, Российская Федерация, Владимирская обл.,  
Петушинский р-н, п. Вольгинский, Владимирская ул., 14Б

Представлены результаты сравнительного исследования иммуногенности двухкомпонентной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия) при разных путях введения мышам линии BALB/c (после введения первого или обоих компонентов). Об иммуногенности судили по изменению уровня антигенспецифических антител IgG и IgA в крови и бронхоальвеолярной жидкости, количеству Т-лимфоцитов, вырабатывающих IFN- $\gamma$  при антигенной стимуляции, количеству антигенспецифических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. Исследование показало, что интраназальное введение индуцировало развитие мукозального иммунитета, значительно превосходя качественно и количественно эффект внутримышечного введения (по количеству животных с антигенспецифическими антителами IgA и титру антител в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже); в то время как внутримышечное несколько превосходило эффект, полученный при интраназальном введении, по влиянию на общее количество продуцирующих IFN- $\gamma$  CD8-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, векторная вакцина, мукозальный иммунитет, иммуногенность

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Каторкина Е.И., Лягоскин И.В., Бочарова Е.Н., Болотникова М.В., Борзов А.А., Бельская Н.В., Лисова А.Е., Ульянова К.В., Кудина Н.К., Белянина Н.А., Стрижакова О.М., Першин А.С., Бахарева Я.А., Каргополова П.Е., Васильев А.П., Казаров А.А., Лыков М.В., Хамитов Р.А. Сравнение иммуногенности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» при внутримышечном и интраназальном путях введения в эксперименте. *Биомедицина*. 2023;19(4):56–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-56-69>

Поступила 05.04.2023

Принята после доработки 15.07.2023

Опубликована 10.12.2023

## COMPARATIVE IMMUNOGENICITY OF THE GAM-COVID-VAC VACCINE UNDER INTRANASAL AND INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION

Elena I. Katorkina, Ivan V. Lyagoskin, Eugenia N. Bocharova, Maria V. Bolotnikova,  
Anton A. Borzov, Nataliya V. Belskaya\*, Alena E. Lisova, Ksenia V. Ulyanova,  
Nataliya K. Kudina, Natalia A. Belyanina, Olga M. Strizhakova, Andrey S. Pershin,  
Yana A. Bahareva, Polina E. Kargopolova, Aleksander P. Vasiliev, Aleksander A. Kazarov,  
Maksim V. Lykov, Ravil A. Khamitov

GENERIUM

601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinskiy District,  
Vol'ginskiy Village, Vladimirskaya Str., 14B

In this work, we set out to compare the immunogenicity of the Gam-COVID-Vac two-component vaccine produced by GENERIUM JSC (Russia) following its intranasal or intramuscular administration of the first or both components to BALB/c mice. The immunogenicity was evaluated according to antigen-specific IgG and IgA antibodies in the blood and bronchoalveolar fluid, the number of antigen-specific IFN- $\gamma$ -producing T-lymphocytes, the number of antigen-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4 and CD8 T-lymphocytes. Intranasal administration was shown to induce the mucosal immunity, significantly exceeding both qualitatively and quantitatively the effect of intramuscular administration (by the number of animals with antigen-specific IgA antibodies and the titer of antibodies in blood serum and bronchoalveolar lavage). At the same time, intramuscular administration slightly exceeded the effect obtained under intranasal administration in terms of the total number of CD8-IFN- $\gamma$ -producing lymphocytes.

**Keywords:** SARS-CoV-2, vector vaccine, mucosal immunity, immunogenicity

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Katorkina E.I., Lyagoskin I.V., Bocharova E.N., Bolotnikova M.V., Borzov A.A., Belskaya N.V., Lisova A.E., Ulyanova K.V., Kudina N.K., Belyanina N.A., Strizhakova O.M., Pershin A.S., Bahareva Ya.A., Kargopolova P.E., Vasiliev A.P., Kazarov A.A., Lykov M.V., Khamitov R.A. Comparative Immunogenicity of the Gam-COVID-Vac Vaccine under Intranasal and Intramuscular Administration. *Journal Biomed.* 2023;19(4):56–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-56-69>

Submitted 05.04.2023

Revised 15.07.2023

Published 10.12.2023

## Введение

Человеческие аденовирусы являются очень удобным инструментом в качестве вектора для генной и онколитической терапии, а также для вакцинации [4]. На основе двух типов рекомбинантных аденовирусов (26 серотип — rAd26 и 5 серотип — rAd5), несущих ген S-белка (гликопротеина) вируса SARS-CoV-2 (входит в состав поверхностных молекул вирусной частицы), была разработана «Гам-КОВИД-Вак» (Gam-COVID-Vac, ATX — J07BX03) для профилактики заболевания, вызываемого вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Оба серотипа аденовируса не способны к репликации. Применение вакцины предполагает поочередное введение компонента-1 (содержит rAd26), спустя 3 недели — компонента-2 (содержит rAd5). Такой режим введения обозначен термином «гетерологический прайм-буст». Использование двух серотипов позволяет увеличить диапазон ми-

шеней и уменьшить вероятность нежелательного иммунного ответа на векторную составляющую (который снижает эффективность вакцинации), а режим прайм-буст увеличивает интенсивность и длительность возникающего иммунитета, как показано в случае вакцин против гриппа [7, 8].

Многолетний опыт вакцинации показывает, что путь введения определяет в значительной степени эффективность развивающегося иммунитета: так, пероральная иммунизация обычно стимулирует иммунные реакции в желудочно-кишечном тракте, слизистой оболочке полости рта и носоглоточной лимфоидной ткани, а интраназальная — эффективно индуцирует выработку антител в слюнных железах, лимфоидной ткани, локализованной в носоглоточной области и нижних дыхательных путях [10]. Учитывая, что входными воротами для вируса SARS-CoV-2 являются верхние дыхательные пути, представлялось целесообразным попытаться

использовать ее и для мукозальной иммунизации. Кроме того, замена инъекционной иммунизации на мукозальную позволяет решать ряд проблем: снизить дискомфорт у детей за счет исключения болевого стресса, уменьшить экономические и трудовые затраты при расширении масштабов вакцинопрофилактики, особенно тогда, когда она требуется в ограниченные сроки для больших контингентов [1].

**Целью данной работы** было оценить иммуногенность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» при интраназальном пути введения мышам в сравнении с внутримышечным.

### Материалы и методы

**Вакцина.** Оба компонента представляли собой однородный бесцветный слегка опалесцирующий раствор (рН=7,4), содержащий рекомбинантные аденовирусные частицы с геном гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (компонент-1 — аденовирусные частицы 26 серотипа, компонент-2 — аденовирусные частицы 5 серотипа, концентрация вирусных частиц  $2,0 \times 10^9$ /мл) производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия). В качестве негативного контроля использовали р-р вспомогательных веществ (рН=7,4) производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия).

**Животные.** В экспериментах использованы мыши (самки) SPF-статуса линии BALB/c (производитель: “Taconic Biosciences, Inc.”, США) в возрасте 14 недель на начало исследования. Данная линия обладает высоким уровнем иммунологической реактивности к антигенам вируса SARS-CoV-2 [9, 12]. Условия содержания и использования животных были рассмотрены и одобрены Комиссией по биоэтике АО «ГЕНЕРИУМ». После поступления животные проходили адаптацию в течение 7 дней, во время которой и затем в исследовании их содержали группами в индивидуально вентилируемых клетках, обеспечивая стабиль-

ные параметры микроклимата (температура 22–24°C, влажность 40–60%) при световом режиме дня и ночи 12:12, при свободном доступе к корму и воде. Корм «ЧАРА» для разведения лабораторных животных SPF-категории (ООО «Ассортимент Агро», Россия) и «ВАКА» (ООО «БИОСФЕРА», Россия) перед раздачей автоклавировали. Для поения животных использовали воду, прошедшую подготовку в обратно-осмотической установке (RiOs 100 High Fouling, “Millipore”, Франция) и разлитую в автоклавированные бутылочки. Подстил состоял из смеси 1:4 подстила «Золотой Кот» (производства ООО «ЗКК «Золотой Початок», Россия) и SAFE (производства “J. Rettenmaier&Sohne GmbH+CO”, Германия), перед использованием его автоклавировали. Групповую идентификацию осуществляли при помощи карточек-этикеток, индивидуальную — нанесением меток на ушную раковину. Эвтаназию проводили с использованием двуокси углерода.

**Дизайн исследования.** Формировали 8 групп животных (табл. 1) массой тела 21,4–24,2 г (min — max). Животные групп 1–4 получали плацебо (Пл) или компонент-1 вакцины (ВК1) однократно: группы 1 и 2 получали плацебо (Пл1), группы 3 и 4 — компонент-1 вакцины (ВК1). Вещества вводили внутримышечно (в/м) группам 1 и 3, интраназально (и/н) — группам 2 и 4. Мыши групп 5–8 получали вещества 2 раза: группы 5 и 6 — плацебо (Пл2), группы 7 и 8 — сначала ВК1, через 21 сут — компонент-2 вакцины (ВК2). Путь введения для групп 5 и 7 был в/м, для групп 6 и 8 — и/н. День первого введения считался нулевыми сутками эксперимента.

Отбор образцов (кровь, бронхоальвеолярная жидкость (БАЛ) и селезенка) проводили у животных групп 1–4 на 21-е сут, у групп 5–8 — на 42-е сут. В сыворотке крови и в БАЛ определяли титр антител IgG и IgA, специфичных к пептидам, входящим в структуру S гликопротеина ви-

**Таблица 1.** Распределение животных по группам

**Table 1.** Distribution of animals by groups

Группа	Вводимое вещество	Путь и объем введения	Количество и пол животных	Сутки отбора образцов
1	Пл1	в/м 50 мкл	10 ♀	21
2	Пл1	и/н 50 мкл	10 ♀	21
3	ВК1	в/м 50 мкл	10 ♀	21
4	ВК1	и/н 50 мкл	10 ♀	21
5	Пл2	в/м 50 мкл	10 ♀	42
6	Пл2	и/н 50 мкл	10 ♀	42
7	ВК1+ВК2	в/м 50 мкл	10 ♀	42
8	ВК1+ВК2	и/н 50 мкл	10 ♀	42

руса SARS-CoV-2 (анти-S-IgG и анти-S-IgA). В селезенке оценивали количество Т-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$  при стимуляции пептидами S гликопротеина вируса SARS-CoV-2 (антигенспецифические Т-IFN- $\gamma$ ), количество CD4-позитивных и CD8-позитивных Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ на пептиды гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (антигенспецифические CD4-IFN- $\gamma$  и CD8-IFN- $\gamma$ ). Наблюдение за животными на предмет общего состояния и смертности осуществляли ежедневно, клинический осмотр животных проводили до введения, через 24 ч после введения и перед эвтаназией на 21-е и 42-е сут. Всех павших животных подвергали некропсии и гистологическому исследованию органов с выявленными макроскопически изменениями. Согласно стандартной операционной процедуре в ходе клинического осмотра оценивали упитанность, состояние шерсти и кожного покрова, наличие выделений из естественных отверстий, активность, потребление корма/воды, состояние фекалий, реакцию на руки, тургор кожи, состояние видимых слизистых оболочек, наличие аномалий зубов. Животных взвешивали накануне введения и перед эвтаназией. Об иммуногенности вакцины судили по изменению уровня антигенспецифических антител IgG и IgA в крови и бронхоальвеолярной жидкости, количеству Т-лимфоцитов, вырабатывающих IFN- $\gamma$  при антигенной стимуляции, количеству антигенспеци-

ческих IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов.

**Введение вакцины.** Вакцину (компонент-1 — ВК1 и компонент-2 — ВК2) вводили в дозе  $1,0 \times 10^8$  вирусных частиц каждому животному в объеме 50 мкл, плацебо (Пл) вводили в том же объеме один (Пл1) или два раза (Пл2). Инъекцию проводили в мышцу бедра, при интраназальном пути введения — по 25 мкл в каждую ноздрю.

Отбор и подготовка проб крови, БАЛ и селезенки. Отбор крови проводили после эвтаназии торакотомией в пробирки с активатором свертывания, отделяли сыворотку центрифугированием (1000 об./мин, 5 мин, 20°C), разливали сыворотку на 3 аликвоты и хранили до проведения анализа при температуре не выше -50°C. После отбора крови животное фиксировали на препаровальном столике, последовательно выполняли разрезы кожи, подкожной клетчатки, поверхностных фасций от нижнегрудинной области до верхнего отдела шеи, сепарировали мышцы, выделяли трахею. Проводили под трахею лигатуру и делали микроразрез, вводили в него иглу и затягивали лигатуру. Затем медленно вводили 0,5 мл стерильного физ. р-ра для инфузий, отбирали жидкость и переносили ее в пробирки. Процедуру введения и забора раствора повторяли дважды. Полученную БАЛ центрифугировали (2300 об./мин 10 мин при 20°C), надосадочную жидкость переносили в стерильные пробирки и до анализа хранили при темпе-

ратуре не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ . Селезенку выделяли и помещали в чашки Петри со стерильным изотоническим фосфатно-солевым буферным р-ром, удаляли капсулу и жир, гомогенизировали, процеживали полученные суспензии через фильтр для клеток (“Falcon® 70  $\mu\text{m}$  Cell Strainer Corning Inc.”, США) и осаждали клетки центрифугированием (1200 об./мин, 5 мин). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в среде для криоконсервации и разливали по пробиркам. Пробирки хранили до анализа при температуре не выше  $-152^{\circ}\text{C}$ .

**Выявление антител классов IgA и IgG, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, и определение их титра.**

Использовали методы непрямого иммуноферментного анализа, которые предварительно были валидированы в соответствии с работами [6, 11]. В качестве носителя антигена использовали готовые планшеты с иммобилизованным гликопротеином S из набора реагентов «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Россия). В лунки планшета вносили по 100 мкл сыворотки или БАЛ (в виде серии разведений от 1/100), инкубировали 1 ч в шейкере-термостате (скорость вращения 250 об./мин,  $37^{\circ}\text{C}$ ), трижды промывали буферным р-ром, вносили антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (поликлональные козьи антитела к мышинным IgA или IgG производства “Abscam”, Великобритания), инкубировали в шейкере-термостате 1 ч (скорость вращения 250 об./мин,  $37^{\circ}\text{C}$ ), трижды промывали. Вносили по 100 мкл хромогенного субстрата к пероксидазе хрена, инкубировали 5 мин при комнатной температуре до развития голубой окраски. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М р-ра  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и измеряли оптическую плотность (ОП) фотометром Microplate Manager® 6 (xMark, “Bio-Rad”, США) при длине волны 450 нм.

При выявлении антител определяли их титр, для чего рассчитывали нормированный коэффициент в каждом разведении как соотношение ОП образца к ОП буферного р-ра. Титр антител определяли по формуле:

$$\text{Титр} = R_H + \left( \frac{(\bar{K}_H - 2,0) \times (R_L - R_H)}{(\bar{K}_H - \bar{K}_L)} \right),$$

где  $R_H$  — максимальный коэффициент разведения исследуемого образца (ИО), нормированный коэффициент которого выше предельного значения;  $K_H$  — нормированный коэффициент для ИО с максимальным разведением, превышающим предельное значение;  $K_L$  — нормированный коэффициент для исследуемого образца с минимальным разведением ниже предельного значения;  $R_L$  — минимальный коэффициент разведения ИО, нормированный коэффициент которого ниже предельного значения;  $R_H$  — максимальный коэффициент разведения ИО, нормированный коэффициент которого выше предельного значения; 2,0 — предельное значение нормированного коэффициента, оцененное при валидации метода.

**Определение количества Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$  при стимуляции антигеном.** Использовали набор Mouse IFN- $\gamma$  ELISpot PLUS Kit (“MABTECH”, Швеция) и метод ELISpot, предварительно валидированный в соответствии с работой [6]. Суспензию спленоцитов после разморозки и отмывки переводили в питательную среду DMEM/F12 (“Sigma Aldrich”, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (“HyClone”, США) с концентрацией  $3,0 \times 10^6$  кл/мл. В лунки 96-луночного плоскостонного планшета из коммерческого набора, покрытые антителами к IFN- $\gamma$  мыши, вносили по 100 мкл суспензии спленоцитов каждого животного и S-белок SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), в лунках негативного контроля присутствовали только спленоциты, в лун-

ки позитивного контроля к спленцитам добавляли 10 мг/мл конканавалина А (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Инкубировали 12–48 ч (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажность 95%), затем лунки промывали, вносили детектирующие биотинилированные антитела, инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После отмывки вносили р-р стрептовидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. После отмывки вносили р-р субстрата, инкубировали в темном месте при комнатной температуре 10–30 мин до появления отчетливо видимых пятен в позитивном контроле. Окрашенные пятна подсчитывали с помощью AID Classic ELISpot Reader (“AID GmbH”, Германия), из количества пятен в лунках с антигеном (S-белок вируса SARS-CoV-2) вычитали количество пятен в лунках со средой (негативный контроль).

**Определение антигенспецифических IFN-γ-продуцирующих CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитов.** Методика была предварительно валидирована в соответствии с работой [6]. Суспензию спленцитов после разморозки и отмывки переводили в питательную среду DMEM/F12 (“Sigma Aldrich”, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (“HyClone”, США) с концентрацией клеток 5,0×10<sup>6</sup>/мл. В лунки 96-луночного круглодонного планшета (“Corning”, США) вносили по 100 мкл суспензии спленцитов каждой мыши и S-белок SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), в лунках негативного контроля присутствовали только спленциты, в лунки позитивного контроля кроме спленцитов добавляли 10 мкг/мл конканавалина А (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Инкубировали 24±1 ч (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажность 95%), затем добавляли р-р ингибитора транспорта белка, содержащего брэфельдин А (“BD Biosciences”), инкубировали в тех же условиях еще 4 ч. Клетки отмывали, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, добавляли реагент для определения жизнеспособных клеток

Fixable Viability Stain 510 (“BD Biosciences”), инкубировали 7±2 мин при 37°C, отмывали и добавляли р-р Fc Block (“BD Biosciences”). Затем в лунки вносили реагенты для иммунофенотипирования (все — производства “BD Biosciences”): крысиные антитела против CD3 мыши, конъюгированные с PerCP-Cy™ 5.5 Клон 17A2, против CD4 мыши, конъюгированные с PE Клон RM4-5, против CD8 мыши, конъюгированные с BV515, Клон 53-6,7. Планшет инкубировали в темноте 30 мин (5°C), отмывали, осадок каждой лунки ресуспендировали в 100 мкл р-ра для фиксации Fixation Buffer (“BD Biosciences”), инкубировали в течение 20 мин (5°C), клетки отмывали р-ром для пермеабиллизации и отмывки Perm/Wash (“BD Biosciences”) и ресуспендировали в 100 мкл этого же раствора, инкубировали 20 мин (5°C), отмывали, ресуспендировали в 50 мкл этого же раствора и добавляли крысиные антитела против IFN-γ мыши, конъюгированные с BV421, клон XMG1.2 (“BD Biosciences”). Инкубировали 30 мин в темноте (5°C), отмывали и ресуспендировали р-ром для пермеабиллизации и отмывки Perm/Wash. Интенсивность флуоресценции измеряли на 3-лазерном проточном цитометре Canto II (“Becton Dickinson”, США). Использовали следующий порядок гейтирования: выделяли живые клетки, затем CD3+ популяцию, затем CD4+ и CD8+ клетки, в популяциях CD4+ или CD8+ Т-клеток выделяли клетки, позитивные по маркерам IFN-γ. Для достоверности получаемых данных в живых клетках собирали не менее 50000 событий. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения FlowJo 7.6.5 и MS Excel, GrafPad Prism 8.0. По результатам анализа рассчитывали среднее значение процентного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток по маркерам IFN-γ. Если коэффициент вариации (% CV) значений для каждого образца превышал 30%, то исследование повторялось.

**Патоморфологическое исследование.** Павших животных вскрывали, оценивали

состояние трупа (выделения из естественных отверстий, состояние кожи, брюшины), органы грудной клетки и брюшной полости, оболочки мозга и головной мозг; органы с выявленными макроскопически изменениями отбирали для приготовления гистологических препаратов и их последующего анализа. После фиксации формалиновым буфером образцы обезживали, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином и изучали с использованием микроскопа Leica DM4000.

**Методы статистической обработки данных.** Межгрупповое сравнение количества особей с антителами проводили с использованием  $\chi^2$ . Для сравнения групп по содержанию антител после логарифмической трансформации по основанию 10 оценили соответствие значений лог-титра нормальному распределению (по критерию Шапиро — Уилка), при нормальном распределении использовали двухфакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением методом Тьюки. Сравнение групп по содержанию CD4+ и CD8+ клеток проводили методом попарного межгруппового сравнения Сидака

(Šidák's test) и двухфакторным дисперсионным анализом (2-way ANOVA). Для определения статистических выбросов был использован критерий Граббса. Для вычислений и построения графиков использовали программу GraphPad Prism 8.0.

## Результаты исследований

**Состояние животных в период наблюдения.** Клинические осмотры не выявили отклонений в состоянии здоровья. Масса тела животных мало изменялась в период наблюдения, различий между группами по динамике массы тела не было. В группах 6 (Пл2 и/н) и 7 (BK1+BK2 в/м) погибло по одному животному (на 35-е и 5-е сут соответственно). Макро- и микроскопических изменений, подтверждающих, что причиной гибели могло быть введенное вещество, не обнаружено.

**Антитела классов IgA и IgG, специфичные к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2.** В группах, получавших плацебо, анти-S-IgG и анти-S-IgA не обнаружены как в сыворотке крови, так и в БАЛ (табл. 2).

Введение BK1+BK2 и/н вызывало появления анти-S-IgG и анти-S-IgA в сыворотке крови у большего количества животных,

**Таблица 2.** Количество животных с антителами IgA и IgG, специфичными к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, в сыворотке крови и БАЛ в группах, получавших плацебо одно- или двукратно (Пл1 или Пл2), вакцину (один BK1 или два компонента BK1+BK2) внутримышечно (в/м) или интраназально (и/н)

**Table 2.** The number of animals with IgA and IgG antibodies specific to the SARS-CoV-2 virus glycoprotein S in the blood serum and BAL in the groups receiving placebo once or twice (Pl1 or Pl2), the vaccine (VC1 or VC1+VC2) intramuscularly (i/m) or intranasally (i/n)

Группа	Анти-S-IgA		Анти-S-IgG	
	сыворотка	БАЛ	сыворотка	БАЛ
1 (Пл1 в/м) n=10	0	0	0	0
2 (Пл1 и/н) n=10	0	0	0	0
3 (BK1 в/м) n=10	3	0	3	0
4 (BK1 и/н) n=10	8	0	10	0
5 (Пл2 в/м) n=10	0	0	0	0
6 (Пл2 и/н) n=9	0	0	0	0
7 (BK1+BK2 в/м) n=9	1	0	9	9
8 (BK1+BK2 и/н) n=10	10 <sup>a</sup>	4	10 <sup>a</sup>	8

**Примечание:** а — различия с группой 7 статистически значимы ( $\chi^2$ ,  $p < 0,0001$ ).

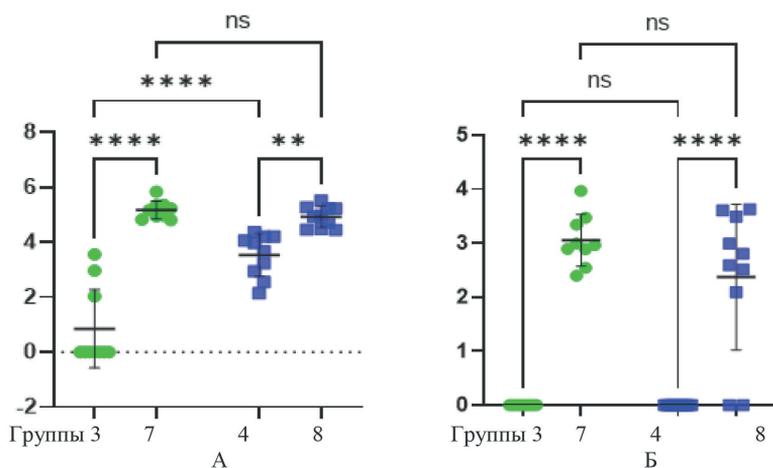
**Note:** a — differences with group 7 are statistically significant ( $\chi^2$ ,  $p < 0,0001$ ).

чем внутримышечное. Титр в сыворотке крови анти-S-IgA был выше при и/н введении в группах ВК1 и ВК1+ВК2, чем при в/м: в группе 3 у всех мышей составил менее 1:100, в группе 4 у шести мышей был меньше или равен 1:100, по одному животному имело титр 1:113 и 1:164; в группе 7 у одного животного титр ниже 1:100, в группе 8 титр в среднем составлял около 1:755 (min 1:100, max 1:1833). Титр анти-S-IgA в БАЛ в группе 4 в среднем составлял 1:380 (min 1:100, max 1:838). По лог-титру анти-S-IgA в сыворотке крови группа 4 статистически значимо превосходила группу 3 (Р-значение для попарного сравнения с поправкой Тьюки < 0,0001).

ВК1, вне зависимости от пути введения, менее эффективно стимулировало появление анти-S-IgG в сыворотке крови (рис. 1А) и БАЛ животных (рис. 1Б), чем введение ВК1+ВК2. Интраназальное введение ВК1

в большей степени стимулировало появление анти-S-IgG в сыворотке крови, чем внутримышечное, при введении ВК1+ВК2 эффективность стимуляции анти-S-IgG была сопоставима после в/м или и/н введения.

**Количество Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ при антигенной стимуляции.** Количество темно-фиолетовых пятен в лунке, соответствующее количеству Т-лимфоцитов, секретирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, оценивали в двух повторностях. Из полученных усредненных значений вычитали количество пятен в отрицательном контроле (спленциты в среде), получив нормированное число пятен. В группах, которым вводили плацебо, нормированное число пятен не превышало 6,5 и в большинстве случаев находилось в интервале от -2,0 до 2,5. Не обнаружено статистически значимых различий между

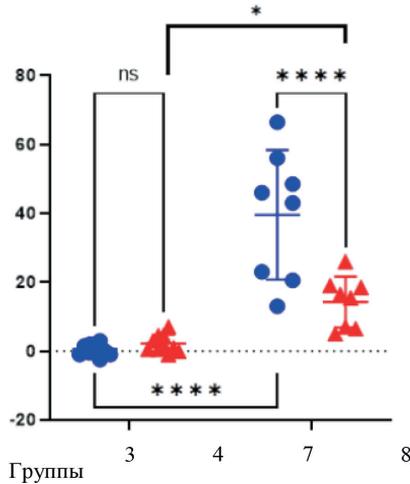


**Рис. 1.** Сравнение уровня антител класса IgG, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2 (лог-титр), в сыворотке крови животных (А) и в БАЛ (Б) в группах 3 (ВК1 в/м), 7 (ВК1+ВК2 в/м), 4 (ВК1 и/н) и 8 (ВК1+ВК2 и/н).

**Примечание:** зеленым цветом обозначены группы, получавшие вакцину внутримышечно (в/м), синим — интраназально (и/н); ns означает отсутствие статистически значимых различий, \*\* или \*\*\*\* — наличие различий (попарное межгрупповое сравнение методом Тьюки, Р-значение с поправкой Тьюки < 0,0001).

**Fig. 1.** Comparison of the level of IgG antibodies specific to the SARS-CoV-2 virus glycoprotein S (log titer) in the blood serum of animals (A) and BAL (B) in groups 3 (BK1 i/m), 7 (BK1+BK2 i/m), 4 (BK1 i/n) and 8 (BK1+BK2 i/n).

**Note:** green indicates groups that received the vaccine intramuscularly (i/m), blue — intranasally (i/n); ns means no statistically significant differences, \*\* or \*\*\*\* — the presence of differences (pairwise intergroup comparison by the Tukey method, P-value with Tukey correction < 0.0001).



**Рис. 2.** Сравнение количества Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2 (нормированное число пятен), в клетках, выделенных из селезенки животных групп 3 (BK1 в/м), 4 (BK1 и/н), 7 (BK1+BK2 в/м) и 8 (BK1+BK2 и/н).

**Примечание:** синим цветом обозначены группы, получавшие вакцину внутримышечно (в/м), красным — интраназально (и/н); ns означает отсутствие статистически значимых различий, \* или \*\*\*\* — наличие различий (парное межгрупповое сравнение методом Сидака, P-значение с поправкой Сидака < 0,0001).

**Fig. 2.** Comparison of the number of T-lymphocytes producing IFN- $\gamma$  in response to stimulation by glycoprotein S of the SARS-CoV-2 virus (normalized number of spots) in the spleen of animals of group 3 (BK1 i/m), 4 (BK1 i/n), 7 (BK1+BK2 i/m) and 8 (BK1+BK2 i/n).

**Note:** the blue color indicates the groups that received the vaccine intramuscularly (i/m), red — intranasally (i/n); ns means no statistically significant differences, \* or \*\*\*\* — the presence of differences (pairwise intergroup comparison by Sidak method, P-value with Sidak correction < 0.0001).

группами 1 (Пл1 в/м) и 3 (BK1 в/м), 2 (Пл1 и/н) и 4 (BK1 и/н).

BK1, вне зависимости от пути введения, не приводило к повышению количества антигенспецифических Т-IFN- $\gamma$  в селезенке мышей (рис. 2). Введение BK1+BK2 вызывало увеличение популяции антигенспецифических Т-IFN- $\gamma$ , при этом эффект от внутримышечного введения превосходил таковой при интраназальном введении.

**Количество антигенспецифических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов.** Введение BK1 в/м или и/н (табл. 3) не приводило к повышению количества антигенспецифических CD4-IFN- $\gamma$ , но увеличивало вдвое популяцию CD8-IFN- $\gamma$ . Введение BK1+BK2 вызывало увеличение количества как CD4-IFN- $\gamma$ , так и CD8-IFN- $\gamma$ . Изменение в размере популяций CD4-IFN- $\gamma$  и CD8-IFN- $\gamma$  после введе-

ния BK1 или BK1+BK2 не зависело от пути введения.

По влиянию на размер популяции антигенспецифических CD4-IFN- $\gamma$  (рис. 3) введение BK1 в/м или и/н между собой не различались. Введение BK1+BK2 в/м приводило к большему увеличению популяции антигенспецифических CD8-IFN- $\gamma$ , чем и/н введение.

## Обсуждение результатов

Выявление антител, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2 в ответ на введение вакцины, показало, что и/н способ введения в сравнении с в/м значительно сильнее стимулирует выработку антител (анти-S-IgG и анти-S-IgA). Это различие в первую очередь проявляется в значимом увеличении количества животных с анти-

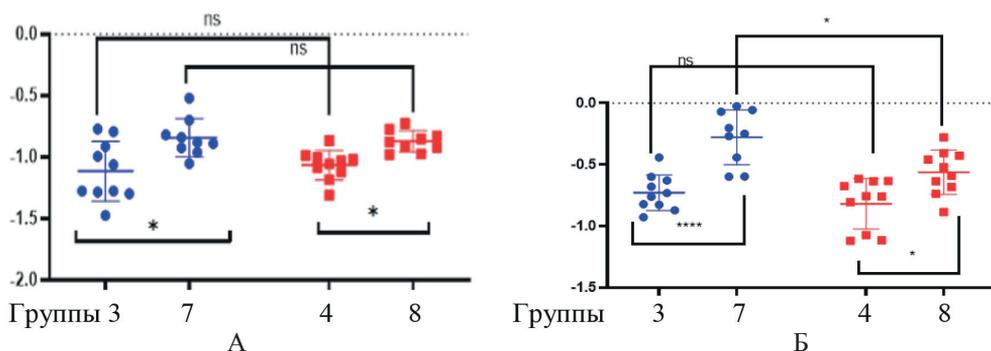
**Таблица 3.** Количество CD4 и CD8 позитивных T-лимфоцитов (в % от всех CD3-позитивных клеток), продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, в селезенке животных, получавших плацебо одно- или двукратно (Пл1 или Пл2), вакцину (один ВК1 или два компонента ВК1+ВК2) внутримышечно (в/м) или интраназально (и/н) (Mean±SD)

**Table 3.** The number of CD4 and CD8 positive T-lymphocytes (in % of all CD3-positive cells) producing IFN-γ in response to stimulation by glycoprotein S of the SARS-CoV-2 in the spleen of animals receiving placebo once or twice (Пл1 or Пл2), the vaccine (BK1 or BK1+BK2) intramuscularly (i/m) or intranasally (i/n) (Mean±SD)

Группа	CD4-IFN-γ (%)	CD8-IFN-γ (%)
1 (Пл1 в/м) n=10	0,06±0,02	0,09±0,02
2 (Пл1 и/н) n=10	0,07±0,01	0,07±0,02
3 (BK1 в/м) n=10	0,08±0,04	0,20±0,07 <sup>a</sup>
4 (BK1 и/н) n=10	0,09±0,02	0,17±0,07 <sup>b</sup>
5 (Пл2 в/м) n=10	0,06±0,02	0,08±0,02
6 (Пл2 и/н) n=9	0,06±0,01	0,07±0,02
7 (BK1+BK2 в/м) n=9	0,15±0,06 <sup>a</sup>	0,59±0,27 <sup>a</sup>
8 (BK1+BK2 и/н) n=10	0,13±0,04 <sup>c</sup>	0,30±0,12 <sup>c</sup>

**Примечание:** различия статистически значимы (2-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ): <sup>a</sup> — с группой 1; <sup>b</sup> — с группой 2; <sup>c</sup> — с группой 3; <sup>c</sup> — с группой 4.

**Note:** the differences are statistically significant (2-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ): <sup>a</sup> — with group 1; <sup>b</sup> — with group 2; <sup>c</sup> — with group 3; <sup>c</sup> — with group 4.



**Рис. 3.** Сравнение количества CD4 (А) и CD8 (Б) позитивных T-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2 (логарифм процент), в селезенке животных групп 3 (BK1 в/м), 4 (BK1 и/н), 7 (BK1+BK2 в/м), и 8 (BK1+BK2 и/н).

**Примечание:** синим цветом обозначены группы, получавшие вакцину внутримышечно (в/м), красным — интраназально (и/н); ns означает отсутствие статистически значимых различий, \* — наличие различий (парное межгрупповое сравнение методом Сидака, P-значение с поправкой Сидака  $< 0,0001$ ).

**Fig. 3.** Comparison of the number of CD4 (A) and CD8 (Б) positive T-lymphocytes producing IFN-γ in response to stimulation by glycoprotein S of the SARS-CoV-2 (logarithm percentage) in the spleen of animals of groups 3 (BK1 i/m), 4 (BK1 i/n), 7 (BK1+BK2 i/m), and 8 (BK1+BK2 i/n).

**Note:** the blue color indicates the groups that received the vaccine intramuscularly (i/m), red — intranasally (i/n); ns means no statistically significant differences, \* — the presence of differences (pairwise intergroup comparison by Sidak method, P-value with Sidak correction  $< 0,0001$ ).

талами в сыворотке, но отчасти и в более высоком титре антител (табл. 2, рис. 1).

С другой стороны, введение обоих компонентов вакцины (BK1+BK2) в сравнении

с одним компонентом BK1 значимо повышает титр анти-S-IgG в сыворотке, хотя в отношении анти-S-IgA этот эффект не так заметен и проявляется только при и/н вве-

дении. Кроме того, только после введения второго компонента антитела появляются в БАЛ (анти-S-IgG — у большинства особей, анти-S-IgA — у отдельных животных и только при и/н введении).

Аналогичные результаты получены и другими авторами, которые показали, что исследуемая ими вакцина на основе аденовирусного вектора Ad5, несущего ген S белка SARS-CoV-2, при однократном и/н введении сильнее стимулировала мукозальный иммунитет (анти-S-IgA) у мышей линии BALB/c и хомячков, чем при в/м введении, но слабее стимулировала гуморальный ответ (анти-S-IgG) [14]. Подобные результаты получены и при и/н введении шимпанзе вакцины на основе аденовирусного вектора с геном S белка SARS-CoV-2: однократное и/н введение обеспечивало превосходный иммунитет против вируса SARS-CoV-2, в большей степени, чем одна или две в/м иммунизации той же дозой [5]. По данным [2], эффективность нескольких вариантов вакцин на основе аденовирусных векторов, несущих гены разных белков вируса SARS-CoV-2, длительность нахождения антител к разным белкам вируса была вдвое выше после и/н введения (антитела сохранялись в количестве 4-недельного уровня спустя еще 4 недели). Возможность при помощи вакцины вызвать появление мукозального иммунитета особенно важна, если иметь в виду, что у многих людей обнаруживается иммунитет к Ad5, развившийся до вакцинирования в результате предшествующей встречи с вирусом, что способно снижать эффективность вакцинации аденовекторной вакциной Ad5 [15]. В таком случае появление антигенспецифических IgA в секрете дыхательных путей после вакцинации способно предотвращать инфекцию или ослаблять ее течение.

Иммунизация одним компонентом вакцины (BK1), вне зависимости от пути введения, не приводила к повышению в селезенке общего количества Т-лимфоцитов,

продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, при этом в обеих группах (BK1 в/м и BK1 и/н) выявлено двукратное увеличение количества CD8-IFN- $\gamma$ , но не CD4-IFN- $\gamma$  (табл. 3). После введения второго компонента (BK2) наблюдалось значительное увеличение популяции антигенспецифических Т-IFN- $\gamma$ , при этом эффект от в/м введения превосходил таковой при и/н (рис. 2). Увеличение количества Т-лимфоцитов в селезенке, продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, после введения BK2 происходило в основном за счет повышения доли CD8-IFN- $\gamma$ , количество которых практически удваивалось по сравнению с введением только BK1 (табл. 3). По стимулирующему эффекту на клеточный иммунитет в/м введение превосходило и/н. Более сильное стимулирующее влияние на количество антигенспецифических CD8-IFN- $\gamma$ , но не CD4-IFN- $\gamma$ , в селезенке мышей после в/м пути введения в сравнении с и/н получено и другими авторами [3, 13]. Однако в исследовании [2] при оценке популяции антигенспецифических IFN- $\gamma$ -продуцирующих клеток в БАЛ и лимфоидной ткани дыхательных путей показано, что и/н путь введения более эффективно стимулировал локализованный в дыхательных путях противовирусный иммунный ответ. Следует заметить, что для вирусов, вызывающих респираторные заболевания (в т.ч. SARS-CoV-2), иммунная система слизистой оболочки дыхательных путей является первой линией защиты, которая опосредована преимущественно антителами IgA, вырабатываемыми эпителиальными клетками слизистой оболочки. Поэтому и/н путь введения вакцины, вызывающий появление анти-S-IgA, представляется более предпочтительным, чем в/м.

## Выводы

1. Интраназальный путь введения, в сравнении с внутримышечным, значительно сильнее стимулировал выработку антител классов IgG и IgA. Это различие в первую очередь проявлялось в значимом увеличении количества животных с антителами в сыворотке крови.

2. Введение двух компонентов вакцины, в сравнении с монотерапией компонентом 1, значимо повышало титр антител (в первую очередь IgG) в сыворотке крови. Кроме того, только после введения второго компонента антитела появлялись и в образцах бронхоальвеолярного лаважа.

3. Эффект интраназального введения компонента 1 вакцины по иммуногенно-

сти в отношении клеточного иммунитета мало отличался от эффекта, полученного при внутримышечном введении (по количеству Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, по размеру популяций антигенспецифических CD4- и CD8-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$ ).

4. Введение обоих компонентов вакцины внутримышечно по влиянию на общее количество продуцируемых IFN- $\gamma$  при стимуляции гликопротеином S вируса SARS-CoV-2 Т-лимфоцитов и размер популяции CD8-лимфоцитов превосходило эффект, полученный при интраназальном введении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века. *Педиатрическая фармакология*. 2009;6(5):96–106. [Semenov B.F., Zverev V.V., Khaitov R.M. Prognostic development of vaccine prevention in the first decades of the 21st century]. *Pediatric pharmacology*. 2009;6(5):96–106. (In Russian)].
2. Afkhami S., D'Agostino M.R., Zhang A., Stacey H.D., Marzok A., et al. Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2. *Cell*. 2022;185:896–915. DOI: 10.1016/j.cell.2022.02.005.
3. Chavda V.P., Vora L.K., Pandya A.K., Patravale V.B. Intranasal vaccines for SARS-CoV-2: From challenges to potential in COVID-19 management. *Drug Discov Today*. 2021;26(11):2619–2636. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.07.021.
4. Gao J., Mese K., Bunz O., Ehrhardt A. State-of-the-art human adenovirus vectorology for therapeutic approaches. *FEBS Lett*. 2019;593(24):3609–3622. DOI: 10.1002/1873-3468.13691.
5. Hassan A.O., Kafai N.M., Dmitriev I.P., Fox J.M., Smith B.K., et al. A Single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell*. 2020;183(1):169–184.
6. Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2019.
7. Khurana S., Coyle E.M., Dimitrova M., Castellino F., Nicholson K., et al. Heterologous prime-boost vaccination with MF59-adjuvanted H5 vaccines promotes antibody affinity maturation towards the hemagglutinin HA1 domain and broad H5N1 cross-clade neutralization. *PLoS One*. 2014;9(4):e95496. DOI: 10.1371/journal.pone.0095496.
8. Leroux-Roels I., Roman F., Forgue S., Maes C., De Boever F., et al. Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: an open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study. *Vaccine*. 2010;28(3):849–857. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.017.
9. Lv H., Wu N.C., Tsang O.T. Yuan M., Perera R.A., et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. *Cell Rep*. 2020;31(9):107725. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107725.
10. Miquel-Clopés A., Bentley E.G., Stewart J.P., Carding S.R. Mucosal vaccines and technology. *Clin. Exp. Immunol*. 2019;196(2):205–214. DOI: 10.1111/cei.13285.
11. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y.C., Bowsher R., et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2008;48(5):1267–1281.
12. Smith T.R.F., Patel A., Ramos S., Dustin E., Zhu X., et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate

- for COVID-19. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2601. DOI: 10.1038/s41467-020-16505-0.
13. van der Ley P.A., Zariri A., van Riet E., Oosterhoff D., Kruiswijk C.P. An intranasal OMV-based vaccine induces high mucosal and systemic protecting immunity against a SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol.* 2021;12:781280. DOI: 10.3389/fimmu.2021.781280.
14. Wu S., Zhong G., Zhang J., Shuai L., Zhang Z., et al. A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat. Commun.* 2020;11(1):4081. DOI: 10.1038/s41467-020-17972-1.
15. Zhu F.-C., Li Y.-H., Guan X.-H., Hou L.-H., Wang W.-J., et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet.* 2020;395(10240):1845–1854. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31208-3.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Каторкина Елена Ивановна**, к.в.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [katorkina@ibcgenerium.ru](mailto:katorkina@ibcgenerium.ru)

**Elena I. Katorkina**, Cand. Sci. (Vet.), GENERIUM;  
e-mail: [katorkina@ibcgenerium.ru](mailto:katorkina@ibcgenerium.ru)

**Лягоскин Иван Владимирович**, к.б.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [lyagoskin@ibcgenerium.ru](mailto:lyagoskin@ibcgenerium.ru)

**Ivan V. Lyagoskin**, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;  
e-mail: [lyagoskin@ibcgenerium.ru](mailto:lyagoskin@ibcgenerium.ru)

**Бочарова Евгения Николаевна**, к.б.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [Varenik@ibcgenerium.ru](mailto:Varenik@ibcgenerium.ru)

**Eugenia N. Bocharova**, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;  
e-mail: [Varenik@ibcgenerium.ru](mailto:Varenik@ibcgenerium.ru)

**Болотникова Мария Валентиновна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [bolotnikova@ibcgenerium.ru](mailto:bolotnikova@ibcgenerium.ru)

**Maria V. Bolotnikova**, GENERIUM;  
e-mail: [bolotnikova@ibcgenerium.ru](mailto:bolotnikova@ibcgenerium.ru)

**Борзов Антон Александрович**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [borzov@ibcgenerium.ru](mailto:borzov@ibcgenerium.ru)

**Anton A. Borzov**, GENERIUM;  
e-mail: [borzov@ibcgenerium.ru](mailto:borzov@ibcgenerium.ru)

**Бельская Наталия Витальевна\***, д.м.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [nvbelskaya@generium.ru](mailto:nvbelskaya@generium.ru)

**Nataliya V. Belskaya\***, Dr. Sci. (Med.), GENERIUM;  
e-mail: [nvbelskaya@generium.ru](mailto:nvbelskaya@generium.ru)

**Лисова Алёна Евгеньевна**, АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [aelisova@ibcgenerium.ru](mailto:aelisova@ibcgenerium.ru)

**Alena E. Lisova**, GENERIUM;  
e-mail: [aelisova@ibcgenerium.ru](mailto:aelisova@ibcgenerium.ru)

**Ульянова Ксения Владимировна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [ulyanova@ibcgenerium.ru](mailto:ulyanova@ibcgenerium.ru)

**Ksenia V. Ulyanova**, GENERIUM;  
e-mail: [ulyanova@ibcgenerium.ru](mailto:ulyanova@ibcgenerium.ru)

**Кудина Наталья Константиновна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [kudina@ibcgenerium.ru](mailto:kudina@ibcgenerium.ru)

**Nataliya K. Kudina**, GENERIUM;  
e-mail: [kudina@ibcgenerium.ru](mailto:kudina@ibcgenerium.ru)

**Белянина Наталья Анатольевна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [nabelyanina@ibcgenerium.ru](mailto:nabelyanina@ibcgenerium.ru)

**Natalia A. Belyanina**, GENERIUM;  
e-mail: [nabelyanina@ibcgenerium.ru](mailto:nabelyanina@ibcgenerium.ru)

**Стрижакова Ольга Михайловна**, к.в.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [strizhakova@ibcgenerium.ru](mailto:strizhakova@ibcgenerium.ru)

**Olga M. Strizhakova**, Cand. Sci. (Vet.), GENERIUM;  
e-mail: [strizhakova@ibcgenerium.ru](mailto:strizhakova@ibcgenerium.ru)

**Першин Андрей Сергеевич**, к.в.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [aspershin@generium.ru](mailto:aspershin@generium.ru)

**Andrey S. Pershin**, Cand. Sci. (Vet.), GENERIUM;  
e-mail: [aspershin@generium.ru](mailto:aspershin@generium.ru)

**Бахарева Яна Алексеевна**, АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [yabahareva@generium.ru](mailto:yabahareva@generium.ru)

**Yana A. Bahareva**, GENERIUM;  
e-mail: [yabahareva@generium.ru](mailto:yabahareva@generium.ru)

**Каргополова Полина Евгеньевна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [peignatieva@ibcgenerium.ru](mailto:peignatieva@ibcgenerium.ru)

**Polina E. Kargopolova**, GENERIUM;  
e-mail: [peignatieva@ibcgenerium.ru](mailto:peignatieva@ibcgenerium.ru)

**Васильев Александр Павлович**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [vasilev@ibcgenerium.ru](mailto:vasilev@ibcgenerium.ru)

**Aleksander P. Vasiliev**, GENERIUM;  
e-mail: [vasilev@ibcgenerium.ru](mailto:vasilev@ibcgenerium.ru)

**Казаров Александр Александрович**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [kazarov@ibcgenerium.ru](mailto:kazarov@ibcgenerium.ru)

**Aleksander A. Kazarov**, GENERIUM;  
e-mail: [kazarov@ibcgenerium.ru](mailto:kazarov@ibcgenerium.ru)

**Лыков Максим Валерьевич**, к.м.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
e-mail: [lykov@ibcgenerium.ru](mailto:lykov@ibcgenerium.ru)

**Maksim V. Lykov**, Cand. Sci. (Med.), GENERIUM;  
e-mail: [lykov@ibcgenerium.ru](mailto:lykov@ibcgenerium.ru)

**Хамитов Равиль Авгатович**, д.м.н., проф.,  
заслуженный деятель науки РФ,  
АО «ГЕНЕРИУМ»

**Ravil A. Khamitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Honored  
Scientist of the Russian Federation, GENERIUM

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author