



**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор НИИФКИ

А.Н. Силков

2024г.

### **Выписка из отчета**

по результатам исследований 2 и 3 этапов работ согласно технического задания по договору № 10/НИР от 11марта 2024 г. по теме «**Изучение иммуноактивных свойств RNA VERUM(ТМ) (амфифильной высокополимерной РНК из пекарских дрожжей в виде хитозановых нанокapsул) при пероральном введении экспериментальным животным in vivo**»

#### ***Цель исследования:***

Изучение иммуноактивных свойств RNA VERUM™ на экспериментальных животных in vivo. Сравнительная оценка эффекта применения амфифильной высокополимерной РНК из пекарских дрожжей в виде хитозановых нанокapsул в зависимости от дозы и длительности перорального введения (per os) в дозе эквивалентной человеческой - 25 мг/сутки курсом 30 дней и 50 мг/сутки курсом 14 дней.

#### ***Материалы и методы:***

В работе использовали мышей аутбредных ICR (CD-1) разнополых (самцы и самки) 8-10 недельного возраста, полученных из вивария НИИИМ СО РАН (г. Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Опытные группы животных: RNA VERUM™ вводили животным перорально (per os), однократно в сутки, в одно и тоже время (утром) в объеме 0,5 мл в дозе эквивалентной человеческой - 25 мг/сутки курсом 30 дней и 50 мг/сутки курсом 14 дней. (с учетом коэффициента пересчета доз-11,87). Животные контрольных групп получали воду в таком же объеме и аналогичным способом.

У части животных оценивали клеточный иммунитет по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по окончании курса перорального введения: измеряли величину отёка лапки после введения разрешающей дозы эритроцитов барана (ЭБ) сенсibilизированным животным по стандартной



методике; сенсibiliзирующая доза  $-2,5 \times 10^7$  ЭБ/мышь внутривбрюшинно, разрешающая доза –  $5 \times 10^8$  ЭБ/мышь под подошвенный апоневроз задней лапки на 4 сутки, контроль - контралатеральная лапка, в которую вводили среду в том же объеме; Учет реакции производили через 24 часа после введения разрешающей дозы ЭБ, величину отека оценивали штангенциркулем. Результаты выражали в процентах по формуле [(опыт – контроль)/контроль] x100%.

У остальных животных производили забор крови на сыворотку по окончании приема препарата для дальнейшего использования материала в иммуноферментном исследовании. Оценка уровня IFN- $\gamma$  и INF $\alpha$ -1 в сыворотке крови мышей была проведена иммуноферментным методом. Для определения использовались наборы Mouse IFN- $\gamma$  ELISA kit, ABclonal, Китай и Mouse INF $\alpha$ -1 ELISA kit, ABclonal, Китай. Уровень цитокинов измеряли на мультимодальном планшетном ридере LB 941 TriStar (Berthold Technologies, Германия), при длинах волн 450 нм и 630 нм согласно рекомендациям производителя.

Статистическую обработку проводили в пакете прикладных программ Statistica 7.0 для Windows. Данные представлены в виде средних значений. Для выявления значимых значений сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни. Выявленные различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Результаты:**

*Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа.*

В таблице 1 представлены данные о влиянии RNA VERUM™, введенного в индуктивную фазу развития реакции гиперчувствительности замедленного типа, то есть введение препарата до сенсibiliзации.

Таблица 1. Влияние препарата RNA VERUM™ на клеточный иммунный ответ (ГЗТ) у аутбредных мышей ICR (CD-1).

Группы	Введение препарата RNA VERUM™			
	50 мг/сутки курсом 14 дней		25 мг/сутки курсом 30 дней	
	самцы♂	самки♀	самцы♂	самки♀
Контроль	48,6 (n=3)	54,4(n=3)	34,8(n=3)	59(n=3)
Опыт	40,9(n=3) - 15%	40,9(n=3) -25%	37(n=2) +6%	65(n=2) +10%

*Примечание: представлены средние значения по группам в процентах (%)*



Ни при одной из схем введения в опытных группах относительно контрольных достоверных изменений на уровень клеточного ответа у мышей, как у самцов, так и самок, не выявлено.

Следует отметить, что в опытной группе 1, то есть при введении более высокой дозы менее длительным курсом, наблюдается снижение ГЗТ на 15% у самцов и на 25 % у самок), однако, эти различия из-за малой выборки в группах не достоверны. Требуется дополнительные исследования на больших выборках экспериментальных животных.

#### Определение уровня *IFN-γ* и *IFNα-1*

Таблица 2. Уровень *IFN-γ* (pg/ml) у аутбредных мышей ICR (CD-1) при пероральном введении RNA VERUM™ в дозе эквивалентной человеческой - 50 мг/сутки курсом 14 дней (опытная группа 1) и 25 мг/сутки курсом 30 дней (опытная группа 2) относительно соответствующих контрольных групп.

Группы	INFгамма(INF -γ) (pg/ml)			
	50 мг/сутки курсом 14 дней		25 мг/сутки курсом 30 дней	
	самцы♂	самки♀	самцы♂	самки♀
Контроль	25(n=4)	39,6(n=5)	41,5(n=4)	51 (n=6)
Опыт	111(n=4)	202(n=7)	145 (n=4)	150,7 (n=7)
достоверность	k♀ - o♀ p=0,56		k♀ - o♀ p=0,18	
	k♂ -o♂ p=0,15		k♂ - o♂ p=0,24	
	k♀+k♂ - o♀+o♂ p=0,15		k♀+k♂ - o♀+o♂ p=0,02	

Как видно из данных, представленных в таблицах 2 обе схемы введения RNA VERUM™ дают повышение выработки INF -γ у животных обоих полов.

Так, в опытной группе 1 уровень интерферона повышен в 4,4 раза у самцов и в 5 раз у самок, относительно контрольных значений, и 3,5 и 3 раза (самцы и самки, соответственно) в опытной группе 2. При этом, достоверные различия получены только в общей популяции животных при дозе эквивалентной человеческой 25 мг/сутки курсом 30 дней (повышение в 3 раза, p=0,02).

Несмотря на статистическую недостоверность в группах самцов и самок, что легко объяснить малыми размерами выборок, обнаруженное многократное повышение уровня *INF-γ* под воздействием препарата во всех исследованных группах может свидетельствовать об эффективности применения RNA VERUM™ в этом отношении. Рекомендуется провести дополнительные исследования с большими размерами групп по выборке животных.



Таблица 3. Уровень IFN альфа-1(INFa-1) ( pg/ml) у аутбредных мышей ICR (CD-1) при пероральном введении RNA VERUM™ в дозе эквивалентной человеческой - 50 мг/сутки курсом 14 дней (опытная группа 1) и 25 мг/сутки курсом 30 дней (опытная группа 2) относительно соответствующих контрольных групп .

Группы	IFN альфа-1(INFa-1) (pg/ml)			
	50 мг/сутки курсом 14 дней		25 мг/сутки курсом 30 дней	
	самцы♂	самки ♀	самцы♂	самки♀
Контроль	5,5 (n=4)	4,7(n=5)	6,75(n=4)	9,2(n=6)
Опыт	15,45(n=4)	10,45(n=7)	25,5(n=4)	22 (n=7)
достоверность	k♀ - o♀ p=0,44		k♀ - o♀ p=0,41	
	k♂ - o♂ p=0,03		k♂ - o♂ p=0,03	
	k♀+k♂ - o♀+o♂ p=0,14		k♀+k♂ - o♀+o♂ p=0,06	

В случае INFальфа-1 стимулирующий эффект RNA VERUM™ проявляется у животных обоих полов и при разных дозах и длительности введения, но достоверные изменения обнаружены только у самцов: повышается уровень INFa-1 от 3 до 3,7 раза, относительно контрольных значений.

Достоверных изменений уровня двух исследованных интерферонов (INFa-1, INF -γ) на введение препарата RNA VERUM™ между опытными группами животных не обнаружено. Однако, выявленное двукратное повышение IFN альфа-1 у опытных животных при длительном приеме препарата может дать почву для обсуждения за продвижения такого курса лечения в дальнейшем. Требуется дополнительные исследования на больших выборках экспериментальных животных.

**Заключение:** препарат RNA VERUM™ в дозе, эквивалентной человеческой 25 мг/сутки курсом 30 дней достоверно способен стимулировать продукцию IFN-γ в общей популяции животных и продукцию INFa-1 у самцов при обеих схемах введения RNA VERUM™. Достоверных изменений на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) не выявлено.

Ответственный исполнитель

Заведующий лаборатории экспериментальной иммунотерапии, канд. биол. наук



Гаврилова Е.Д.

24 октября 2024г.