

Исследование иммуотоксических свойств пегилированной гиалуронидазы

К.И. Ершов^{1,2}, А.М. Швецова², Е.Ю. Шерстобоев³, А.А. Чурин³, В.В. Жданов³,
М.А. Королев², П.Г. Мадонов^{1,2}

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

² НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³ НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

Резюме

Разработка безопасных лекарственных средств занимает особое место в фарминдустрии. Одной из основных задач ее доклинического этапа является оценка возможного токсического действия разрабатываемого препарата на организм и на различные системы, в том числе иммунную. Целью работы было изучить иммуотоксические свойства пегилированной гиалуронидазы (ПЭГ-ГИАЛ). **Материал и методы.** Мышей F1(CBA/C57Bl/6) разделили на подгруппы, которым вводили ПЭГ-ГИАЛ внутривенно и внутривентально в разных дозах (50, 500, 1250, 2500 и 5000 ЕД/кг). У животных определяли количество антителообразующих клеток в селезенке, массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета, фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов, реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), уровень гемагглютининов к эритроцитам барана, спонтанную и индуцированную митогенами пролиферацию спленоцитов. **Результаты.** ПЭГ-ГИАЛ не индуцировала ГЗТ, не подавляла фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, в дозе 50 ЕД/кг не влияла существенно на содержание гемагглютининов к эритроцитам, однако в дозе 500 ЕД/кг статистически значимо снижала титр специфических антител. При воздействии ПЭГ-ГИАЛ в дозе 50 и 500 ЕД/кг у подопытных животных уменьшалась спонтанная и индуцированная митогенами пролиферация спленоцитов. **Заключение.** В ходе проведенного эксперимента по введению ПЭГ-ГИАЛ мышам получены результаты, которые можно использовать для обоснования возможности применения лекарственного препарата на основе ПЭГ-ГИАЛ.

Ключевые слова: пегилированная гиалуронидаза, иммуотоксические свойства.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Швецова А.М., e-mail: aleksa-2904@mail.ru

Для цитирования: Ершов К.И., Швецова А.М., Шерстобоев Е.Ю., Чурин А.А., Жданов В.В., Королев М.А., Мадонов П.Г. Исследование иммуотоксических свойств пегилированной гиалуронидазы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(5):118–126. doi: 10.18699/SSMJ20230512

Study of the immunotoxic properties of pegylated hyaluronidase

K.I. Ershov^{1,2}, A.M. Shvetsova², E.Yu. Sherstoboev³, A.A. Churin³, V.V. Zhdanov³,
M.A. Korolev², P.G. Madonov^{1,2}

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

² Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Federal Research Center
Institute of Cytology and Genetics SB RAS
630060, Novosibirsk, Timakova st., 2

³ Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine E.D. Goldberg Tomsk National Research
Medical Center of the Russian Academy of Sciences
634028, Tomsk, Lenina ave., 3

Abstract

The development of safe drugs occupies a special place in the pharmaceutical industry. One of the main tasks of its preclinical phase is to evaluate possible toxic effects of the developed drug on the body and on various systems, including the immune system. The aim of our work was to study immunotoxic properties of pegylated hyaluronidase (PEG-HYAL). **Material and methods.** Mice F1(CBA/C57Bl/6) were divided into subgroups which were intragastric and intraperitoneally administered with PEG-HYAL in different dosages (50, 500, 1250, 2500 and 5000 U/kg). The number of antibody-producing cells in the spleen, the mass and cellularity of central and peripheral immune organs, phagocytic activity of peritoneal macrophages and neutrophils, delayed hypersensitivity reaction (DHR), level of hemagglutinin to sheep erythrocytes, spontaneous and mitogen-induced splenocyte proliferation were determined. **Results.** PEG-HYAL did not induce DHR, did not suppress phagocyte activity of peritoneal macrophages, at a dose of 50 ED/kg did not significantly affect the hemagglutinin content to erythrocytes, but at a dose of 500 ED/kg did statistically significantly reduce the titer of specific antibodies. When experimental animals were exposed to PEG-HYAL at doses of 50 and 500 U/kg, spontaneous and mitogen-induced proliferation of splenocytes decreased. **Conclusions.** The PEG-HYAL trial produced results that can be used to substantiate the administration of the PEG-HYAL-based medication.

Key words: pegylated hyaluronidase, immunotoxic properties.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Shvetsova A.M., e-mail: aleksa-2904@mail.ru

Citation: Ershov K.I., Shvetsova A.M., Sherstoboev E.Yu., Churin A.A., Zhdanov V.V., Korolev M.A., Madonov P.G. Study of the immunotoxic properties of pegylated hyaluronidase. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(5):118–126. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230512

Введение

Гиалуронидазы представляют собой семейство ферментов, расщепляющих гиалуроновую кислоту и другие гликозаминогликаны до полимеров с различной молекулярной массой и разным влиянием на «клеточное поведение» [1]. Гиалуроновая кислота широко распространена по всему организму, является составным компонентом межклеточного матрикса тканей, гликокаликса клеток и их рецепторов. Показана возможность увеличения резерва стволовых клеток в организме, потенцирования выхода в кровь клеток-предшественников под влиянием факторов мобилизации с помощью гиалуронидазы, а также усиления специфического действия определенных цитокинов путем предварительной обработки клеток-мишеней данным ферментом [2]. Препараты на основе гиалуронидазы обладают способностью увеличивать проницаемость гистогематических барьеров для соединений. Имеются сведения о способности фермента оказывать терапевтический эффект при лечении рубцов и контрактур, стимулировать процесс кроветворения [3].

Обширное рациональное использование препаратов на основе ферментов весьма ограничено ввиду того, что они физиологически нестабильны, быстро выводятся, пирогенны, а также обладают высокой антигенностью в силу того, что организм распознает их в качестве чужеродных белков. Молекулы гиалуронидазы стабилизируют с помощью молекулярного носителя с образованием комплекса, пригодного для эффективного и безопасного использования. На фармацевтиче-

ском рынке иммобилизованная на полимерном носителе гиалуронидаза существует в виде лекарственного препарата лонгидазы, который представляет собой композицию конъюгата фермента с физиологически активным высокомолекулярным носителем из группы производных N-оксида поли-1,4-этиленпиперазина. Нативная гиалуронидаза за сутки при температуре 37 °C распадется, в то время как в комплексе с носителем сохраняется более 70 % фермента в активном состоянии в течение 20 суток при инкубации в условиях, которые максимально приближены к физиологическим [4]. Еще одним вариантом является иммобилизация гиалуронидазы на активированном с помощью пучка свободных электронов полиэтиленоксиде (ПЭГ) с молекулярной массой 1,5 кДа [5].

Гиалуронидаза имеет белковую природу, вследствие чего, как сказано выше, может быть распознана организмом как чужеродный объект и стимулировать направленный против нее иммунный ответ, что может стать причиной различных аллергических реакций. При валидации по оценке иммуотоксических свойств препаратов-кандидатов, которые находятся в стадии разработки, особое внимание сосредоточено на потенциальном риске возникновения и проявления реакции иммуносупрессии или гиперстимуляции иммунных процессов. Изучение данных процессов позволяет избежать снижения резистентности организма к различным инфекционным агентам, риска развития заболевания в условиях, где патологическим звеном выступает гиперреактивность иммунной системы [6].

Цель исследования – изучить иммунотоксические свойства пегилированной по технологии электронно-лучевого синтеза тестикулярной гиалуронидазы (ПЭГ-ГИАЛ).

Материал и методы

Исследование выполнено в трех учреждениях, которые указаны в аффилиации. Публикация данной статьи одобрена на заседании Локального этического комитета клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, протокол № 179 от 23.03.2023.

Объект исследования

ПЭГ-ГИАЛ, изготовленная в АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск) и любезно предоставленная для экспериментальных исследований в рамках научного сотрудничества, представляет собой тестикулярную гиалуронидазу H20, подвергнутую электронно-лучевой иммобилизации на полиэтиленоксиде (макрогол 1500) потоком ускоренных электронов в дозе 1,5 МРад, которые создаются импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, г. Новосибирск). Используемая в настоящей работе ПЭГ-ГИАЛ – лиофилизированный порошок светло-серого цвета с ферментативной активностью 2800 ЕД в 1 грамме сухого вещества, легко растворяющийся в кристаллоидных и коллоидных растворах. Для исследования иммунотоксических свойств ПЭГ-ГИАЛ применялась в жидком виде во флаконах по 4 мл с концентрацией 167 ЕД/мл в 2%-м ПЭГ.

На основе ПЭГ-ГИАЛ нет зарегистрированных лекарственных препаратов. Однако имеется многолетний опыт исследований по выявлению влияния соединения на регенеративную активность. Ввиду вышесказанного была выдвинута идея о возможности использования ПЭГ-ГИАЛ в качестве средства для регенеративной медицины, которое предусматривает курсовое применение. В таком случае наиболее приемлемым и комплаентным будет местный и пероральный прием.

Минимальная доза ПЭГ-ГИАЛ, равная 50 ЕД/кг массы тела мышей, выбрана на основании проведенных нами ранее исследований, в которых, будучи введена внутримышечно, демонстрировала специфическую фармакологическую активность [7].

Экспериментальные животные

В исследовании использованы мыши-гибриды обоего пола F1(CBA/C57Bl/6) в количестве

154, полученные из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ РАН. Данные мыши являются наиболее изученной линией инбредных грызунов с полностью расшифрованным геномом. Они неприхотливы, легко размножаются, достаточно долгоживущие и не склонны к образованию опухолей [8].

Животных содержали согласно правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), ГОСТ 33216-2014 Межгосударственный стандарт «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» от 01.07.2016, ГОСТ 33215-2014 Межгосударственный стандарт «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» от 01.07.2016. Заключительным этапом было выведение животных из эксперимента, которое состоялось через 24 часа методами эвтаназии согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

ПЭГ-ГИАЛ вводили внутривентриально однократно в дозах 50, 500, 1250, 2500 и 5000 ЕД/кг, предварительно растворив в 0,2 мл стерильного 0,9%-го раствора NaCl, а также курсом внутримышечно в течение 5 суток в тех же дозах, в то время как группе контроля вводили в эквивалентном объеме растворитель (2%-й ПЭГ). Группу мышей использовали в качестве фона при изучении влияния ПЭГ-ГИАЛ на гуморальный иммунный ответ при однократном и курсовом введении, при определении интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), им вводили антиген без курсового введения 2%-го раствора ПЭГ. Группу интактных мышей соответствующего возраста и пола использовали в качестве фона при изучении влияния ПЭГ-ГИАЛ на такие показатели, как масса и клеточность центральных и периферических органов иммунитета, а также при оценке фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и нейтрофилов, спонтанной и индуцированной митогенами пролиферации спленоцитов. В каждой группе было по 6–8 особей.

Оценка иммунотоксических свойств ПЭГ-ГИАЛ

Исследование иммунотоксических свойств ПЭГ-ГИАЛ проведено согласно «Методическим указаниям по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ» [9].

Предварительная оценка иммунотоксичности ПЭГ-ГИАЛ при однократном введении

ПЭГ-ГИАЛ вводили однократно внутрибрюшинно в дозах 500, 1250, 2500 и 5000 ЕД/кг. Животных контрольной и опытных групп через 1 час иммунизировали эритроцитами барана из расчета 2×10^7 на одну мышь, на четвертые сутки детектировали антителообразующие клетки (АОК) в селезенке методом локального гемолиза [10]. Для этого выделенную и очищенную селезенку гомогенизировали в 5 мл раствора Хенкса, фильтровали и подсчитывали общее количество спленоцитов (ОКС). Комплемент разводили в 5 мл раствора Хенкса, к 0,5 мл полученной суспензии добавляли 0,5 мл 10%-й взвеси эритроцитов барана, заполняли полученной смесью камеру из двух покровных стекол, соединенных тонким слоем парафина, и инкубировали 45 минут при 37 °С. Под световым микроскопом подсчитывали количество АОК из расчета на 1000 клеток, выражали в относительных (%) и абсолютных (10⁶/орган) единицах.

Определение влияния ПЭГ-ГИАЛ на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета

Завершив курсовое внутрижелудочное введение ПЭГ-ГИАЛ, мышей забивали методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Извлекали тимус, селезенку, подколенный лимфатический узел и бедренную кость, взвешивали [9], из органов готовили суспензию в виде взвеси клеток в растворе Хенкса при pH 7,4, фильтровали и методом центрифугирования отмывали в течение 5 минут. Подсчитывали ОКС и общее количество тимоцитов, общее количество лимфоцитов в лимфоузле. Костный мозг из бедренной кости вытесняли, используя среду 199, гомогенизировали и подсчитывали общее количество кариоцитов и долю ядросодержащих клеток.

Определение влияния ПЭГ-ГИАЛ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов оценивали после курсового внутрижелудочного введения ПЭГ-ГИАЛ. Мышей забивали путем декапитации, вводили внутрибрюшинно 5 мл раствора Хенкса, переднюю стенку брюшной полости массировали, шприцем осуществляли забор ее содержимого в силиконизированные пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 1000 оборотов в минуту. Осадок ресуспендировали в растворе Хенкса, в камере Горяева подсчитывали число клеток и доводили до концентрации 1×10^6 макрофагов/мл. Добавив в соотношении 1:10 равный объем час-

тиц меламинаформальдегидного латекса размером 1,5–2 мкм ($60\text{--}80 \times 10^3/\text{мкл}$), инкубировали 30 минут при 37 °С на шейкере, затем готовили мазки на предметном стекле, фиксировали по методу Май – Грюнвальда метиленовым синим 5 минут, окрашивали азуром II и эозином в течение 15 минут. Учтя процент макрофагов, поглотивших частички латекса, определяли фагоцитарный индекс (ФИ). Подсчитав среднее число частиц, поглощенных одной клеткой, находили фагоцитарное число (ФЧ) [9].

Определение влияния ПЭГ-ГИАЛ на фагоцитарную активность нейтрофилов

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли через 24 часа после завершения курсового внутрижелудочного введения ПЭГ-ГИАЛ. В лунки круглодонных планшетов добавляли по 3 мкл раствора гепарина (5000 ЕД/мл) и 10 мкл взвеси частиц латекса ($60\text{--}80 \times 10^3/\text{мкл}$), вносили 10 мкл периферической крови из хвостовой вены и инкубировали 30 минут при 37 °С на шейкере. Затем планшеты центрифугировали в течение 5 минут при 1000 оборотов в минуту, удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали, готовили мазки на предметном стекле, фиксировали по методу Май – Грюнвальда метиленовым синим 5 минут, окрашивали азуром II и эозином в течение 15 минут, определяли ФИ и ФЧ [9].

Определение влияния ПЭГ-ГИАЛ на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Влияние ПЭГ-ГИАЛ на клеточный иммунный ответ исследовали с помощью проведения реакции ГЗТ [9]. Для этого после курсового внутрижелудочного введения ПЭГ-ГИАЛ мышей сенсibilизировали 10 мМ раствором тринитробензолсульфоновой кислоты (подкожно, 0,2 мл в основание хвоста), через 6 сут в подушечку задней лапы вводили разрешающую дозу (50 мкл 10 мМ раствора), в контралатеральную лапу – равный объем стерильного 0,9 % NaCl. Интенсивность реакции ГЗТ оценивали через 24 ч, рассчитывая индекс реакции (ИР) по формуле:

$$\text{ИР} = (M_{\text{оп}} - M_{\text{к}}) / M_{\text{к}} \times 100 \%,$$

где $M_{\text{оп}}$ – масса «опытной» лапы; $M_{\text{к}}$ – масса «контрольной» лапы.

Определение влияния ПЭГ-ГИАЛ на уровень геммагглютининов к эритроцитам барана

Чтобы определить, как введение ПЭГ-ГИАЛ влияет на выработку антител, по завершении курсового внутрижелудочного введения ПЭГ-ГИАЛ с помощью стандартной реакции геммагглютинации определяли титр геммагглютининов ($\log_2 T$) в сыворотке крови мышей на 7-е сутки после им-

мунизации внутрибрюшинно эритроцитами барана в субоптимальной дозе (5×10^7 на мышь) [11].

Использовали 96-луночные круглодонные планшеты, в которые вносили по 50 мкл 0,9%-го раствора NaCl. В 1-ю лунку вносили 50 мкл сыворотки крови, разбавленной в 5 раз и предварительно нагретой до 56 °С в течение 30 минут для инактивации комплемента, все перемешивали и переносили по 50 мкл из одной лунки в другую. В каждую лунку добавляли по 25 мкл суспензии эритроцитов барана, инкубировали при комнатной температуре в течение 3 ч, периодически встряхивая планшеты. Проанализировав результаты реакции, определили наибольшее разведение сыворотки, где наблюдали отчетливую агглютинацию эритроцитов барана.

Определение влияния ПЭГ-ГИАЛ на спонтанную и индуцированную митогенами пролиферацию спленоцитов

Проведение реакции бласттрансформации позволяет полно и объективно оценить пролиферативную активность спленоцитов [9]. Данный метод основан на способности некоторых лектинов вызывать поликлональную активацию и пролиферацию лимфоцитов [12]. Активировать Т- и В-лимфоциты можно с помощью конканавалина А (Кон А) и липополисахарида (ЛПС) соответственно. Полной ростовой средой (среда RPMI 1640, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина) спленоциты доводили до концентрации 2×10^6 /мл, вносили по 50 мкл в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов, добавляли по 50 мкл 10 мкг/мл Кон А или ЛПС, инкубировали в течение 72 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония). Предварительно смешивали 5 мл раствора 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилида (1 мг/мл), 5 мл раствора Хенкса и 100 мкл раствора феназина метасульфата (0,383 мг/мл), за 6 часов до окон-

чания культивирования вносили в каждую лунку по 50 мкл полученной смеси. На иммуноферментном анализаторе «Униплан» (ЗАО «Пикон», г. Москва) при длине волны $\lambda = 492$ нм измеряли оптическую плотность в лунках без добавления митогена (спонтанная пролиферация) и с митогеном, определяли индекс стимуляции путем деления последней на первую.

Статистическую обработку результатов исследования, в случае нормального распределения, проводили, вычисляя среднее значение (M), стандартное отклонение (m), и представляли в виде $M \pm m$. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро – Уилка. В случае нормального распределения для сравнения выборочных средних использовали t -критерий, в случае распределения, отличающегося от нормального, – критерий Манна – Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Предварительная оценка иммуотоксичности ПЭГ-ГИАЛ при однократном введении

Однократное внутрибрюшинное введение ПЭГ-ГИАЛ в дозе 5000 ЕД/кг привело к гибели 4 из 7 мышей, в связи с чем данные, полученные в этой группе, исключены из дальнейшего анализа. При введении ПЭГ-ГИАЛ в дозах 500 и 1250 ЕД/кг не наблюдали статистически значимых изменений изученных показателей по сравнению с группой контроля (табл. 1). Отмечали лишь достоверное снижение относительного числа АОК по сравнению с фоном, в то время как их абсолютное количество статистически значимо не изменялось. При введении ПЭГ-ГИАЛ в дозе 2500 ЕД/кг относительное число АОК было достоверно больше, чем в группе контроля. По полученным данным можно сделать заключение, что ПЭГ-ГИАЛ в различных дозах при однократ-

Таблица 1. Влияние на гуморальный иммунный ответ мышей-гибридов F1(CBA/C57Bl/6) ПЭГ-ГИАЛ при однократном введении

Table 1. Effect on the humoral immune response of F1(CBA/C57Bl/6) hybrid mice by PEG-HYAL single injection

Группа	Число ОКС, 10%/орган	Число АОК, %	Число АОК, 10%/орган
Фон	187,14 ± 20,60	14,14 ± 0,57	26,52 ± 3,37
Контрольная	185,0 ± 6,35	10,37 ± 0,80*	19,36 ± 1,96
500 ЕД/кг ПЭГ-ГИАЛ	218,86 ± 15,42	10,20 ± 0,40*	22,44 ± 2,08
1250 ЕД/кг ПЭГ-ГИАЛ	231,43 ± 21,32	11,97 ± 0,52*	28,23 ± 3,61
2500 ЕД/кг ПЭГ-ГИАЛ	205,57 ± 23,51	12,91 ± 0,50#	26,34 ± 2,73
5000ЕД/кг ПЭГ-ГИАЛ	216,33 ± 84,41	10,93 ± 2,37	26,37 ± 11,46

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – фона, # – группы контроля.

ном введении не вызывает подавления гуморального иммунного ответа у экспериментальных животных.

Влияние ПЭГ-ГИАЛ на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета при курсовом введении

По окончании курсового введения ПЭГ-ГИАЛ в дозе 500 ЕД/кг не отмечали достоверных различий в массе и клеточности центральных и периферических органов иммунитета с аналогичными показателями в контрольной группе, при применении ПЭГ-ГИАЛ в дозе 50 ЕД/кг наблюдали достоверное увеличение числа лейкоцитов в периферической крови, как абсолютного, так и относительного количества спленоцитов и тимоцитов (табл. 2). В обеих группах опыта отмечали статистически значимое снижение относительно содержания клеток лимфоузла по сравнению с фоном, а в группе с применением ПЭГ-ГИАЛ в дозе 50 ЕД/кг – достоверное увеличение массы подколенного лимфоузла, общего количества лейкоцитов, абсолютного и относительного количества спленоцитов и тимоцитов по сравнению с фоновым уровнем.

Можно заключить, что курсовое введение ПЭГ-ГИАЛ в дозе 500 ЕД/кг не оказывает существенного влияния на массу и клеточность цен-

тральных и периферических органов иммунитета мышей-гибридов F1(CBA/C57Bl/6), а в дозе 50 ЕД/кг способствует повышению числа лейкоцитов в периферической крови, клеточности селезенки и тимуса.

Влияние ПЭГ-ГИАЛ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов

Курсовое введение ПЭГ-ГИАЛ в дозе 50 ЕД/кг не приводило к достоверным изменениям фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов по сравнению как с контрольной, так и с фоновой группой (табл. 3). В группе мышей с применением ПЭГ-ГИАЛ в дозе 500 ЕД/кг наблюдали статистически значимое снижение числа поглощенных перитонеальными макрофагами частиц латекса по сравнению с фоном, но не с группой контроля. Как видно из табл. 3, в группах животных, которым вводили ПЭГ-ГИАЛ в дозах 50 и 500 ЕД/кг, отмечали статистически значимое повышение относительного количества фагоцитирующих нейтрофилов (ФИ) по сравнению со значениями как в контрольной, так и в фоновой группе. Применение 500 ЕД/кг ПЭГ-ГИАЛ приводило к достоверному снижению числа поглощенных нейтрофилами частиц латекса относительно показателей группы контроля.

Таблица 2. Влияние курсового введения ПЭГ-ГИАЛ на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета мышей-гибридов F1(CBA/C57Bl/6)

Table 2. Effect of a course administration of PEG-HYAL on the mass and cellularity of the central and peripheral immune organs of F1(CBA/C57Bl/6) hybrid mice

Показатель	Фон	Контрольная группа	ПЭГ-ГИАЛ, 50 ЕД/кг	ПЭГ-ГИАЛ, 500 ЕД/кг
Масса селезенки, мг	85,29 ± 6,70	83,29 ± 2,92	98,86 ± 10,57	84,43 ± 4,52
Масса тимуса, мг	39,57 ± 3,55	31,43 ± 2,46	38,57 ± 3,08	37,86 ± 3,33
Масса подколенного лимфоузла, мг	1,61 ± 0,32	2,80 ± 0,42*	3,40 ± 0,30*	2,04 ± 0,23
Общее количество кариоцитов, 10 ⁶ /бедра	21,07 ± 1,96	22,14 ± 2,30	21,89 ± 1,77	21,36 ± 1,73
Количество лейкоцитов в крови, 10 ⁹ /л	8,86 ± 0,66	8,0 ± 0,42	10,61 ± 0,94 [#]	9,86 ± 1,36
ОКС, 10 ⁶ /на орган	230,00 ± 10,57	221,43 ± 13,76	352,57 ± 33,98* [#]	274,43 ± 29,66
ОКС, %	2,80 ± 0,24	2,69 ± 0,23	3,62 ± 0,23* [#]	3,24 ± 0,29
Общее количество тимоцитов, 10 ⁶ /орган	135,86 ± 14,75	125,14 ± 13,68	197,0 ± 9,66* [#]	159,0 ± 17,86
Общее количество тимоцитов, %	3,62 ± 0,58	3,99 ± 0,35	5,29 ± 0,48* [#]	4,18 ± 0,25
Общее количество лимфоцитов в лимфоузле, 10 ⁶ /орган	2,86 ± 0,22	3,18 ± 0,60	3,61 ± 0,60	2,32 ± 0,19
Общее количество лимфоцитов в лимфоузле, %	2,21 ± 0,40	1,47 ± 0,45	1,07 ± 0,13*	1,18 ± 0,10*

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей:

* – фона, # – группы контроля.

Таблица 3. Влияние курсового введения ПЭГ-ГИАЛ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов мышей-гибридов F1(CBA/C57Bl/6)**Table 3.** Effect of a course administration of PEG-HYAL on the peritoneal macrophage and neutrophil phagocytic activity of F1(CBA/C57Bl/6) mouse hybrids

Группа	Перитонеальные макрофаги		Нейтрофилы	
	ФИ, %	ФЧ	ФИ, %	ФЧ
Фон	24,43 ± 2,03	1,84 ± 0,14	19,71 ± 2,03	3,0 ± 0,33
Контрольная	21,43 ± 1,54	1,83 ± 0,18	18,29 ± 3,39	3,29 ± 0,29
ПЭГ-ГИАЛ, 50 ЕД/кг	27,29 ± 3,40	1,71 ± 0,09	28,0 ± 2,52*#	2,60 ± 0,43
ПЭГ-ГИАЛ, 500 ЕД/кг	22,57 ± 1,48	1,48 ± 0,09*	31,71 ± 3,26*#	2,21 ± 0,22#

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – фона, # – группы контроля.

Таблица 4. Влияние курсового введения ПЭГ-ГИАЛ на интенсивность реакции ГЗТ и уровень гемагглютининов к эритроцитам барана**Table 4.** Effect of a course administration of PEG-HYAL on the intensity of delayed-type hypersensitivity reactions and on haemagglutinin levels to ram red blood cells

Группа	Индекс реакции ГЗТ	Log ₂ T
Фон	24,57 ± 4,42	12,14 ± 0,40
Контрольная	18,75 ± 3,04	12,71 ± 0,18
ПЭГ-ГИАЛ, 50 ЕД/кг	27,11 ± 4,87	11,71 ± 0,42
ПЭГ-ГИАЛ, 500 ЕД/кг	17,60 ± 1,93	11,57 ± 0,48#

Влияние ПЭГ-ГИАЛ на реакцию ГЗТ и уровень гемагглютининов к эритроцитам барана

В группах животных, которым вводили ПЭГ-ГИАЛ в дозах 50 и 500 ЕД/кг, статистически значимых различий в выраженности реакции ГЗТ не выявлено по сравнению как с группой контроля, так и с фоновой (табл. 4). После курсового введения ПЭГ-ГИАЛ в дозе 50 ЕД/кг не наблюдали существенного изменения уровня гемагглютининов в периферической крови мышей по сравнению с группой контроля и фоном; использование ПЭГ-ГИАЛ в дозе 500 ЕД/кг приводило к статистически значимому снижению титра специфических

антител относительно значений контрольной группы (см. табл. 4).

Влияние ПЭГ-ГИАЛ на спонтанную и индуцированную митогенами пролиферацию спленоцитов

Как видно из табл. 5, курсовое введение ПЭГ-ГИАЛ в дозах 50 и 500 ЕД/кг приводило к достоверному снижению спонтанной пролиферации спленоцитов мышей по сравнению с контрольной группой и фоном. В группе с применением ПЭГ-ГИАЛ в дозе 500 ЕД/кг при этом также наблюдалось статистически значимое уменьшение стимулированной митогенами пролиферации лимфоидных клеток по сравнению как с контрольной, так и с фоновой группой.

Заключение

Результаты проведенного исследования по изучению иммунотоксических свойств ПЭГ-ГИАЛ показали, что не происходит подавления фагоцитарной функции макрофагов, не вызывается подавление гуморального иммунного ответа и не возникает реакция ГЗТ.

В дозе 50 ЕД/кг ПЭГ-ГИАЛ при курсовом введении не оказывает существенного влияния на уровень гемагглютининов в периферической крови, однако при увеличении дозы в 10 раз наблюдаются некоторые негативные эффекты, в

Таблица 5. Влияние курсового введения ПЭГ-ГИАЛ на функциональную активность спленоцитов мышей-гибридов F1(CBA/C57Bl/6) в реакции бласттрансформации**Table 5.** Effect of a course administration of PEG-HYAL on the functional activity of splenocytes of F1(CBA/C57Bl/6) mice in the blast-transformation reaction

Группа	Спонтанная пролиферация (единицы оптической плотности)	Индекс стимуляции	
		Кон А	ЛПС
Фон	0,295 ± 0,027	1,25 ± 0,05	1,90 ± 0,08
Контрольная	0,235 ± 0,004*	1,13 ± 0,04	1,50 ± 0,09*
ПЭГ-ГИАЛ, 50 ЕД/кг	0,201 ± 0,004*#	1,04 ± 0,03*	1,33 ± 0,05*
ПЭГ-ГИАЛ, 500 ЕД/кг	0,202 ± 0,004*#	0,97 ± 0,02*#	1,08 ± 0,03*#

частности снижение титра специфических антител. Введении ПЭГ-ГИАЛ в дозах 50 и 500 ЕД/кг приводило к снижению спонтанной пролиферации спленоцитов, в то время как уменьшение стимулированной митогенами пролиферации лимфоидных клеток наблюдается только при дозе препарата 500 ЕД/кг. Курсовое введение ПЭГ-ГИАЛ в дозе 500 ЕД/кг не оказало существенного влияния на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета, а при использовании дозы 50 ЕД/кг наблюдалось повышение в периферической крови экспериментальных животных числа лейкоцитов, спленоцитов и тимоцитов.

Результаты, полученные в данном исследовании, могут быть использованы для обоснования возможностей применения лекарственного препарата на основе ПЭГ-ГИАЛ.

Список литературы

1. Забанова В.Е., Фурсова А.Ж., Мадонов П.Г. Фармакологические свойства гиалуронидазы и возможности ее клинического применения в офтальмологии. *Сиб. науч. мед. ж.* 2020;40(4):11–19. doi: 10.15372/SSMJ20200402
2. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Верещагин Е.И. Регуляция функций прогениторных клеток с помощью гиалуронидазы. *Вестн. РАМН.* 2009;(11):6–9.
3. Дыгай А.М., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Шилова М.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Скурихин Е.Г. Изучение антифибротической активности модифицированной и нативной гиалуронидазы при пневмофиброзе. *Сиб. науч. мед. ж.* 2017;37(4):5–10.
4. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Лонгидаза. Регистрационное удостоверение ЛС-000764-220818. Режим доступа: https://petrovax.ru/upload/instructions/20180822_longidaza_IMP.pdf
5. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Заполотский Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Киншт Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств. *Мед. и образ. в Сибири.* 2013;(4):83.
6. Dusinska M., Tulinska J., El Yamani N., Kurocova M., Liskova A., Rollerova E., Rundén-Pran E., Smolkova B. Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: new strategies for toxicity testing? *Food Chem. Toxicol.* 2017;109(Pt1):797–811. doi: 10.1016/j.fct.2017.08.030
7. Артамонов А.В., Афтанас Л.И., Бекарев А.А., Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н., Удот Е.В. Средство, обладающее регенеративной активностью. Пат. РФ № 2480236. Оpubл. 27.04.2013.

8. Макаров В.Г., Макарова М.Н. Новое в науке и практике доклинических исследований. Сообщение 2. *Лаб. живот. для науч. исслед.* 2020;(3):3–6. doi: 10.29296/2618723X-2020-03-01

9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум; 2000. 398 с.

10. Cunningham A.I. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature.* 1965;207:1106–1107. doi: 10.1038/2071106a0

11. Амброзиус Х., Фибих Х., Вихнер З. Иммунологические методы. М.: Медицина, 1987. 472 с.

12. Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.N., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988;48(17):4827–4833.

References

1. Zabanova V.E., Fursova A.J., Madonov P.G. Hyaluronidase pharmacological properties and clinical application in ophthalmology. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2020;40(4):11–19. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200402
2. Dygai A.M., Zyuzkov G.N., Zhdanov V.V., Vereshchagin E.I. Regulation of progenitor cell functions by hyaluronidase. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2009;(11):6–9. [In Russian].
3. Dygai A.M., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Shilova M.A., Madonov P.G., Kinsht D.N., Skurikhin E.G. Study of antifibrotic activity of modified and native hyaluronidase in pneumofibrosis. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2017;37(4):5–10. [In Russian].
4. Instructions for medical use of the medicine Longidaza. Registration certificate LS-000764-220818. Available at: https://petrovax.ru/upload/instructions/20180822_longidaza_IMP.pdf [In Russian].
5. Madonov P.G., Ershov K.I., Dubrovin A.V., Zapolotsky E.N., Miroshnikov P.N., Shilova M.A., Kinsht D.N. Electron-beam modification of preparations of the albuminous nature for improvement of their pharmacological properties. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia.* 2013;(4):83. [In Russian].
6. Dusinska M., Tulinska J., El Yamani N., Kurocova M., Liskova A., Rollerova E., Rundén-Pran E., Smolkova B. Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: new strategies for toxicity testing? *Food Chem. Toxicol.* 2017;109(Pt1):797–811. doi: 10.1016/j.fct.2017.08.030

7. Artamonov A.V., Aftanas L.I., Bekarev A.A., Dygai A.M., Zhdanov V.V., Zyuzkov G.N., Udut E.V. A remedy with regenerative activity. Patent RF N 2480236; published 27.04.2013. [In Russian].
8. Makarov V.G., Makarova M.N. New in science and practice of preclinical research. Report 2. *Laboratornyye zhivotnyye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science*. 2020;(3):3–6. [In Russian]. doi.org/10.29296/2618723X-2020-03-01
9. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow: Remedium, 2000. 398 p. [In Russian].
10. Cunningham A.I. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*. 1965;207:1106–1107. doi: 10.1038/2071106a0
11. Ambrosius Kh., Fibich Kh., Wikhner Z. Immunological methods. Moscow: Meditsina, 1987. 472 p. [In Russian].
12. Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.N., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(17):4827–4833.

Сведения об авторах:

Ершов Константин Игоревич, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4139-036X, e-mail: ershov_k@bk.ru
Швецова Александра Михайловна, ORCID: 0009-0002-7735-6032, e-mail: aleksa-2904@mail.ru
Шерстобоев Евгений Юрьевич, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-6178-5329, e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru
Чурин Алексей Александрович, д.м.н., e-mail: churin_aa@pharmso.ru
Жданов Вадим Вадимович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, e-mail: zhdanov_vv@pharmso.ru
Королев Максим Александрович, д.м.н., ORCID: 0000-0002-0471-652X, e-mail: kormax@bk.ru
Мадонов Павел Геннадьевич, д.м.н., ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Information about the authors:

Konstantin I. Ershov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4139-036X, e-mail: ershov_k@bk.ru
Alexandra M. Shvetsova, ORCID: 0009-0002-7735-6032, e-mail: aleksa-2904@mail.ru
Evgeniy Yu. Sherstoboev, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-6178-5329, e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru
Aleksey A. Churin, doctor of medical sciences, e-mail: churin_aa@pharmso.ru
Vadim V. Zhdanov, doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, e-mail: zhdanov_vv@pharmso.ru
Maksim A. Korolev, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-4890-0847, e-mail: kormax@bk.ru
Pavel G. Madonov, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.04.2023
После доработки 25.05.2023
Принята к публикации 29.05.2023

Received 12.04.2023
Revision received 25.05.2023
Accepted 29.05.2023