

Клеточный состав экспериментальной химической раны роговицы после воздействия пегилированными ферментами гиалуронидазы и субтилизина

В.Е. Забанова^{1, 2}, К.И. Ершов^{1, 2}, М.С. Селякова¹, Н.П. Леонов², Г.И. Байкалов^{1, 2},
А.Ж. Фурсова^{1, 2}, А.П. Надеев¹, П.Г. Мадонов^{1, 2}

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

²Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . В условиях химического повреждения роговицы существенно нарушается ее клеточная структура, нуждающаяся в экстренной высокодифференцированной регенерации без выраженного пролиферативного компонента воспаления и экспансии иммунокомпетентных клеток для создания антимикробного потенциала. С целью фармакологической инициации этих процессов патогенетически обосновано исследование локального применения ферментных препаратов противовоспалительного действия, таких как субтилизин и гиалуронидаза. **Ц е л ь .** Изучить влияние гиалуронидазы и субтилизина, пегилированных по технологии электронно-лучевого синтеза на полиэтиленгликоле (ПЭГ), на количество иммунокомпетентных клеток в области химической раны роговицы при их субконъюнктивальном и местном введении.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . На 28 кроликах выполнено экспериментальное исследование влияния ферментов гиалуронидазы и субтилизина, пегилированных по технологии радиационного синтеза, на клеточный состав химической раны роговицы. Травму роговицы моделировали, используя методику щелочного ожога Обенберга. В правый глаз животного местно или субконъюнктивально вводился ПЭГ-субтилизин или ПЭГ-гиалуронидаза в зависимости от группы распределения, левый глаз животного использовался как контроль – в него вводили 0.9% NaCl. После проведения эксперимента выполнена энуклеация глаз животных. Полученный биоматериал использовали для приготовления гистологических препаратов с последующим их морфологическим изучением.

Р е з у л ь т а т ы . Общее количество клеток в группах местного и субконъюнктивального применения ПЭГ-субтилизина составило 43 (40; 52) и 73 (33; 92), а субконъюнктивального применения ПЭГ-гиалуронидазы – 46 (37; 61), что оказалось выше количества клеток при применении 0.9% NaCl в этих группах ($p < 0.01$) и выше ($p < 0.0001$) количества клеток в группе местного применения ПЭГ-гиалуронидазы. Общее количество клеток при местном введении ПЭГ-гиалуронидазы составило 15 (13; 16), при местном применении 0.9% NaCl в данной группе – также 15 (14; 18) ($p = 0.38$). Количество нейтрофилов при применении ПЭГ-субтилизина составило 1 (1; 2) при местном и 0 (0; 1) при субконъюнктивальном применении, а при применении ПЭГ-гиалуронидазы – 0 (0; 0) как при местном, так и субконъюнктивальном пути введения.

З а к л ю ч е н и е . Введение ПЭГ-гиалуронидазы субконъюнктивально и ПЭГ-субтилизина как местно, так и субконъюнктивально приводит к усиленной миграции иммунокомпетентных клеток в зону химического повреждения роговицы, при этом миграция нейтрофилов незначительна. Она полностью отсутствует при применении ПЭГ-гиалуронидазы субконъюнктивально. Местное применение ПЭГ-гиалуронидазы не вызывает выраженного клеточного ответа иммунокомпетентных клеток в области химической раны роговицы, и эффект применения сравним с применением 0.9% NaCl.

Ключевые слова: пегилированная гиалуронидаза, пегилированный субтилизин, химическая травма глаза, клеточный состав раны.

Образец цитирования: Забанова В.Е., Ершов К.И., Селякова М.С., Леонов Н.П., Байкалов Г.И., Фурсова А.Ж., Надеев А.П., Мадонов П.Г. Клеточный состав экспериментальной химической раны роговицы после воздействия пегилированными ферментами гиалуронидазы и субтилизина // Journal of Siberian Medical Sciences. 2023;7(1):89-109. DOI: 10.31549/2542-1174-2023-7-1-89-109

Поступила в редакцию 23.01.2023
Прошла рецензирование 31.01.2023
Принята к публикации 14.02.2023

Автор, ответственный за переписку
Забанова Виктория Евгеньевна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: vikazabanova@gmail.com

Received 23.01.2023
Revised 31.01.2023
Accepted 14.02.2023

Corresponding author
Viktoria E. Zabanova: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: vikazabanova@gmail.com

Cellular composition of an experimental chemical injury to the cornea after exposure to PEGylated hyaluronidase and subtilisin enzymes

V.E. Zabanova^{1,2}, K.I. Ershov^{1,2}, M.S. Selyakova¹, N.P. Leonov², G.I. Baykalov^{1,2}, A.Zh. Fursova^{1,2}, A.P. Nadeev¹, P.G. Madonov^{1,2}

¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

²Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Under conditions of chemical damage to the cornea, its cellular structure is significantly disrupted, requiring emergency highly differentiated regeneration without an expressed proliferative component of inflammation and expansion of immunocompetent cells to gain an antimicrobial potential. For the purpose of pharmacological initiation of these processes, the study of the topical administration of anti-inflammatory enzyme preparations, such as subtilisin and hyaluronidase, is pathogenetically justified.

A i m . To study the effect of hyaluronidase and subtilisin, PEGylated (polyethylene glycol – PEG) using the technology of electron beam synthesis on the number of immunocompetent cells in the area of the corneal chemical injury during their subconjunctival and topical administration.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . An experimental study of the effect of PEGylated hyaluronidase and subtilisin enzymes, on the cellular composition of the corneal chemical injury was performed on 28 rabbits. Corneal injury was modeled using the Obenberger alkali burn technique. PEG-subtilisin or PEG-hyaluronidase was applied topically or subconjunctivally into the right eye of the animal, depending on the group, the left eye of the animal was used as a control – it was treated with 0.9% NaCl. After the experiment, enucleation was performed. The biomaterial obtained was used to prepare tissue specimens for morphological examination.

R e s u l t s . The total count of cells in the groups of topical and subconjunctival administration of PEG-subtilisin was 43 (40; 52) and 73 (33; 92), and subconjunctival injection of PEG-hyaluronidase – 46 (37; 61), which was higher than the count of cells when using 0.9% NaCl in these groups ($p < 0.01$) and higher ($p < 0.0001$) cell numbers in the group of topical administration of PEG-hyaluronidase. The total count of cells with topical application of PEG-hyaluronidase was 15 (13; 16), with topical application of 0.9% NaCl of this group – also 15 (14; 18) ($p = 0.38$). The neutrophil count with the use of PEG-subtilisin was 1 (1; 2) with topical and 0 (0; 1) with subconjunctival administration, and with the use of PEG-hyaluronidase – 0 (0; 0) both with topical and subconjunctival administration.

C o n c l u s i o n . The administration of PEG-hyaluronidase subconjunctivally and PEG-subtilisin both topically and subconjunctivally leads to an increased migration of immunocompetent cells to the area of the corneal chemical injury, while the migration of neutrophils is insignificant. It is completely absent when PEG-hyaluronidase is injected subconjunctivally. Topical administration of PEG-hyaluronidase does not induce a pronounced cellular response of immunocompetent cells in the area of the corneal chemical injury, and the effect of the application is comparable to that of 0.9% NaCl.

Keywords: PEGylated hyaluronidase, PEGylated subtilisin, chemical eye injury, cellular composition of a wound.

Citation example: Zabanova V.E., Ershov K.I., Selyakova M.S., Leonov N.P., Baykalov G.I., Fursova A.Zh., Nadeev A.P., Madonov P.G. Cellular composition of an experimental chemical injury of the cornea after exposure to PEGylated hyaluronidase and subtilisin enzymes. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2023;7(1):89-109. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-7-1-89-109

ВВЕДЕНИЕ

Роговица – это часть фиброзной оболочки глаза, которая не имеет ни кровеносных, ни лимфатических сосудов и выполняет функцию химического, физического и биологического барьера. Кровеносные сосуды перилимбальной сети, представляющие собой гематоофтальмический барьер, являются своего рода входными и выходными воротами для иммунных клеток. Их мигра-

INTRODUCTION

The cornea is a part of the fibrous membrane of the eye that has neither blood nor lymphatic vessels, and functions as a chemical, physical and biological barrier. The perilimbal network, which is the blood-ocular barrier, is a kind of entrance and exit gates for immune cells. Their migration into the cornea provides antimicrobial protection and anti-inflammatory processes following its damage. According to

ция в роговицу обеспечивает антимикробную защиту и противовоспалительные процессы после ее повреждения. По современным представлениям поверхность роговицы и конъюнктивы связана с лимфоидной тканью (mucosa-associated lymphoid tissue – MALT). MALT поверхности глаза поддерживает баланс между воспалительной иммунной реакцией на патогенные агенты и толерантностью к непатогенным факторам, предотвращая, таким образом, развитие постоянной воспалительной реакции. Системой MALT опосредуются воспаление глазной поверхности, синдром сухого глаза, аллергические заболевания, травма. Клеточное представительство MALT-системы происходит из костного мозга и тимуса.

Регенерация эпителия роговицы происходит за счет эпителиальных стволовых клеток, которые располагаются в лимбальной нише (палисады Фогта). Регенерации роговицы способствует активный синтез интерлейкинов (IL-6 и IL-10), который осуществляется эпителиальными и иммунными клетками [1]. В экспериментах установлено, что IL-6 усиливает миграцию клеток и заживление ран эпителиальных клеток роговицы кроликов [2–4]. IL-10 подавляет продукцию провоспалительных цитокинов, интерферона, пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и митогены, а также секрецию активированными моноцитами IL-1-бета, ФНО-альфа (фактора некроза опухоли) и IL-6 [2].

Химическая травма роговицы является одним из самых распространенных повреждений глаза. По своей патофизиологической сущности этот процесс проходит все три стадии воспаления. При этом есть несколько весьма важных особенностей, которые, в отличие от химического повреждения мягких тканей и слизистых, обуславливают высокий риск инвалидизирующих осложнений. При эпителиостромальных повреждениях роговицы цитокины, высвобождаемые из поврежденного эпителия, включая IL-1 и ФНО-альфа, опосредуют гибель кератоцитов через систему лигандов Fas-Fas. Выжившие кератоциты, которые не подверглись апоптозу, модулируются поступающим в строму IL-1 для производства хемокинов, включая моноцитарный хемотаксический и активирующий фактор (MCAF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), нейтрофильный активирующий пептид (ENA-78) и моноцитарный нейтрофильный хемотаксический фактор (MDNCF). Кератоциты подвергаются митозу через 12–24 ч после травмы с дальнейшей способностью диф-

modern concepts, the surface of the cornea and conjunctiva is bound with lymphoid tissue (mucosa-associated lymphoid tissue – MALT). Ocular surface MALT maintains a balance between the inflammatory immune response to pathogens and tolerance to non-pathogenic factors, thus preventing the development of a permanent inflammatory response. The MALT system mediates inflammation of the ocular surface, dry eye syndrome, allergic diseases, and trauma. The cell subset of the MALT system originates from the bone marrow and thymus.

Regeneration of the corneal epithelium occurs due to epithelial stem cells which are located in the limbal niche (palisades of Vogt). Corneal regeneration is facilitated by the active expression of interleukins (IL-6 and IL-10), which is carried out by epithelial and immune cells [1]. Experiments have shown that IL-6 enhances cell migration and wound healing of rabbit corneal epithelial cells [2–4]. IL-10 suppresses the production of pro-inflammatory cytokines, interferon, the proliferative response of T cells to antigens and mitogens, as well as the secretion of IL-1 beta, TNF-alpha (tumor necrosis factor) and IL-6 by activated monocytes [2].

Chemical injury of the cornea is one of the most common eye injuries. Pathophysiologically, this process goes through all three stages of inflammation. At the same time, there are several very important features that, in contrast to chemical injury of soft tissues and mucous membranes, determine a high risk of disabling complications. In epithelial-stromal injuries of the cornea, cytokines released from the damaged epithelium, including IL-1 and TNF-alpha, mediate keratocyte apoptosis via the Fas-Fas ligand system. Keratocytes that evaded the apoptosis are modulated by stromal IL-1 to produce chemokines, including monocyte chemotactic and activating factor (MCAF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), neutrophil activating peptide 78 (ENA-78), and monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF). Keratocytes undergo mitosis 12–24 h after injury with a further ability to differentiate into fibroblasts and myofibroblasts and express a less organized collagen-fibrillar structure of the stroma, which contributes to scar formation [5].

Under conditions of chemical damage to the cornea, its cellular structure is significantly disrupted, requiring emergency highly differentiated regeneration without a pronounced proliferative component of inflammation and expansion of immunocompetent cells to gain an antimicrobial potential. For the purpose of pharmacological initiation of these processes, the topical application of enzyme preparations, which are actively used in surgical and thera-

ференцироваться в фибробласты и миофибробласты и экспрессировать менее организованную коллагеново-фибрилярную структуру стромы, что способствует формированию рубца [5].

В условиях химического повреждения роговицы существенно нарушается ее клеточная структура, нуждающаяся в экстренной высокодифференцированной регенерации без выраженного пролиферативного компонента воспаления и экспансии иммунокомпетентных клеток для создания антимикробного потенциала. С целью фармакологической инициации этих процессов весьма перспективно выглядит локальное применение ферментных препаратов, которые активно используются в хирургической и терапевтической практике [6, 7]. Препараты гиалуронидазы и субтилизины являются ферментными лекарственными средствами, которые в настоящий момент не получили широкого применения в лечении заболеваний роговицы. Однако эти ферменты широко используются в урологии, гинекологии, а также в лечении заболеваний легких и печени благодаря своим антипролиферативным и фибринолитическим свойствам. В последние годы появилось много отечественных публикаций о применении нового класса протеолитических ферментных препаратов – субтилизинов [8]. За рубежом статьи о применении субтилизинов появились 18 лет назад [9]. Из всего многообразия протеолитических ферментов субтилизины выделяются двумя основными свойствами: 1) они не обладают сайт-специфичностью по отношению к сочетанию аминокислот в белковой молекуле, которая, в свою очередь, существенно ограничивает возможности применения терапевтического протеолиза; 2) субтилизины преимущественно гидролизуют те белковые молекулы, которые утратили свою нативную глобулу, либо вследствие разрушения четвертичной и третичной структуры и превращения в белковый детрит, либо вследствие полимеризации, как например, фибриноген, превратившийся в фибрин [10].

В настоящее время существует несколько официальных препаратов гиалуронидазы (гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы – код фермента (КФ) 3.2.1.35). Широкое распространение получили Лидаза, Лонгидаза, Ронидаза. Данные препараты получают из семенников крупного рогатого скота (тестикулярная гиалуронидаза). Тестикулярная гиалуронидаза является 4-гликаногидролазой, а ее специфические субстраты – гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота, хондроитин, хондроитин-4-сульфат,

терапевтическая практика, looks very promising [6, 7]. Hyaluronidase and subtilisin preparations are enzyme drugs that are not currently widely used in the treatment of corneal diseases. However, these enzymes are widely used in urology, gynecology, and in the treatment of lung and liver diseases due to their antiproliferative and fibrinolytic properties. In recent years, many domestic publications have appeared on the use of a new class of proteolytic enzyme preparations, subtilisins [8]. Abroad, the articles on the use of subtilisins appeared 18 years ago [9]. Of the variety of proteolytic enzymes, subtilisins are distinguished by two main properties: 1) they do not have site-specificity for the combination of amino acids in a protein molecule which, in turn, significantly limits the possibilities of using therapeutic proteolysis; 2) subtilisins predominantly hydrolyze those protein molecules that have lost their native globule, either due to the destruction of the quaternary and tertiary structure and transformation into protein detritus or due to polymerization, such as fibrinogen, which has turned into fibrin [10].

Currently, there are several officinal preparations of hyaluronidase (hyaluronate-endo- β -N-acetylhexosaminidase – Enzyme Commission number 3.2.1.35). Lydase, Longidaza, Ronidaza are widely used. These drugs are obtained from the testes of cattle (testicular hyaluronidase). Testicular hyaluronidase is a 4-glycanohydrolase, and its specific substrates are glycosaminoglycans (hyaluronic acid, chondroitin, chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate), which form the basis of the connective tissue matrix. As a result of depolymerization (breaking the bond between C $\rightarrow$ 1 acetylglucosamine and C $\rightarrow$ 4 glucuronic or iduronic acids), under the influence of hyaluronidase, glycosaminoglycans lose their basic properties: viscosity, the ability to bind water, metal ions, the formation of collagenous proteins into fibers becomes more difficult, the permeability of tissue barriers increases, the movement of fluid in the intercellular space is facilitated, the elasticity of the connective tissue increases. The chemical properties of hyaluronidase are very successfully converted into pharmacological effects and allow us to consider it as a promising pharmaceutical substance for the treatment of traumas and degenerative diseases [11–19].

The pathogenetic rationale for the use of subtilisin in chemical injury of the eye lies in the proteolysis of the cellular and protein detritus of the wound, a kind of general cleaning of the wound bed for subsequent repair of the cellular subset *de novo*. The role of hyaluronidase is the modification of the intercellular matrix for migration and facilitated homing of

хондроитин-6-сульфат), составляющие основу матрикса соединительной ткани. В результате деполимеризации (разрыва связи между C→1 ацетилглюкозамина и C→4 глюкуроновой или идуруновой кислот) под влиянием гиалуронидазы гликозаминогликаны теряют свои основные свойства: вязкость, способность связывать воду, ионы металлов, затрудняется формирование коллагеновых белков в волокна, увеличивается проницаемость тканевых барьеров, облегчается движение жидкости в межклеточном пространстве, увеличивается эластичность соединительной ткани. Химические свойства гиалуронидазы весьма успешно конвертируются в фармакологические эффекты и позволяют рассматривать ее в качестве перспективной фармацевтической субстанции для лечения травматических и дегенеративных заболеваний [11–19].

Патогенетическое обоснование применения субтилизина при химической травме глаза заключается в протеолизе клеточно-белкового детрита раны, своего рода генеральной уборке раневого ложа для последующей репарации клеточного массива *de novo*. Роль гиалуронидазы – модификация межклеточного матрикса для миграции и облегченного хоминга клеток-предшественников для восполнения посттравматического тканевого дефекта.

Применение белковых лекарственных препаратов имеет ряд общеизвестных ограничений – низкая системная и тканевая биодоступность, аллергенность, иммуногенность. Эти недостатки успешно устраняются при иммобилизации белковых препаратов на инертных носителях, например, на полиэтиленгликоле (ПЭГ) – пегилировании. Одним из методов пегилирования является электронно-лучевой синтез, когда в потоке ускоренных электронов, образованном импульсным линейным ускорителем, происходит конъюгация белковой молекулы с полимерным носителем [20, 21]. Белковые препараты, подвергшиеся электронно-лучевому пегилированию, сохраняют свою нативную фармакологическую активность, при этом существенно улучшают свои фармакокинетические и токсикологические характеристики.

Субтилизин и гиалуронидаза могут проявлять плюрипотентные эффекты на тканевом уровне, особенно в условиях патологического процесса. Поскольку химическая травма глаза будет инициировать несколько саногенных процессов, представляется необходимым оценить влияние изучаемых ферментов на клеточный состав раны в части представительства основных иммуноком-

progenitor cells to compensate for a post-traumatic tissue defect.

The use of protein drugs has a number of well-known limitations – low systemic and tissue bioavailability, allergenicity, immunogenicity. These shortcomings are successfully eliminated by immobilization of protein preparations on inert carriers, for example, on polyethylene glycol (PEG) – PEGylation. One of the PEGylation methods is electron beam synthesis, when a protein molecule is conjugated with a polymer carrier in a stream of accelerated electrons generated by a pulsed linear accelerator [20, 21]. Protein preparations undergoing electron-beam PEGylation retain their native pharmacological activity, while significantly improving their pharmacokinetic and toxicological characteristics.

Subtilisin and hyaluronidase can exhibit pluripotent effects at the tissue level, especially under pathological conditions. Since chemical injury to the eye will initiate several sanogenic processes, it seems necessary to evaluate the effect of the studied enzymes on the cellular composition of the wound in terms of the pool of the main immunocompetent cells, the local presence of which will determine the final success of damage regeneration.

AIM OF THE RESEARCH

To study the effect of hyaluronidase and subtilisin PEGylated by the electron beam synthesis technology, on the number of immunocompetent cells in the area of the corneal chemical injury with their subconjunctival and topical administration.

MATERIALS AND METHODS

The studied preparations PEG-hyaluronidase and PEG-subtilisin were provided by Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology, JSC (Novosibirsk, Russia). Electron beam PEGylation of both enzymes was carried out on polyethylene oxide (Macro-gol-1500) under a beam of accelerated electrons at a dose of 1.5 Mrad, generated by a pulsed linear accelerator ILU-10 (manufactured by the Budker Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk). PEG-subtilisin is a light yellow lyophilized powder with an enzymatic activity of 5400 IU per 1 g of dry matter, easily soluble in crystalloid and colloidal solutions. Experimental dose – 300 IU/ml. PEG-hyaluronidase is a light gray lyophilized powder with an enzymatic activity of 2800 IU per 1 g of dry matter, easily soluble in crystalloid and colloidal solutions. Experimental dose – 150 IU/ml.

Laboratory rabbits are a conventional experimental test system for studying the specific activity of ophthalmic drugs. The study was performed with 28

петентных клеток, локальное присутствие которых будет обуславливать конечный успех регенерации повреждения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние гиалуронидазы и субтилизина, пегилированных по технологии электронно-лучевого синтеза, на количество иммунокомпетентных клеток в области химической раны роговицы при их субконъюнктивальном и местном введении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые препараты ПЭГ-гиалуронидаза и ПЭГ-субтилизин предоставлены АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (Новосибирск, Россия). Электронно-лучевое пегилирование обоих ферментов проведено на полиэтиленоксиде (Макрогол-1500) под пучком ускоренных электронов в дозе 1.5 Мрад, создаваемым импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (производство – Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск). ПЭГ-субтилизин представляет собой лиофилизированный порошок светло-желтого цвета с ферментативной активностью 5400 ЕД в 1 г сухого вещества, легко растворяющийся в кристаллоидных и коллоидных растворах. Экспериментальная доза – 300 ЕД/мл. ПЭГ-гиалуронидаза представляет собой лиофилизированный порошок светло-серого цвета с ферментативной активностью 2800 ЕД в 1 г сухого вещества, легко растворяющийся в кристаллоидных и коллоидных растворах). Экспериментальная доза – 150 ЕД/мл.

Лабораторные кролики являются общепринятой экспериментальной тест-системой по изучению специфической активности офтальмологических препаратов. Исследование выполнено на 28 беспородных кроликах массой 3.5–4 кг. Процедура распределения на экспериментальные группы путем чередования 1/1. Схема исследования представлена на рис. 1. В правый глаз животного вводился ПЭГ-субтилизин или ПЭГ-гиалуронидаза в зависимости от группы распределения, левый глаз животного использовался как контроль – в него вводили 0.9% NaCl.

В экспериментальной офтальмологии для исследования химической травмы роговицы используют щелочной ожог по Обенбергеру. Патологические процессы, развивающиеся у кроликов после щелочной травмы роговицы, соответствуют таковым у человека [22]. Эту модель широко применяют во всем мире для изучения репаративных процессов в глазе и разра-

outbred rabbits weighing 3.5–4 kg. Distribution procedure to experimental groups is 1/1 alternation. The scheme of the study is shown in Fig. 1. PEG-subtilisin or PEG-hyaluronidase were applied to the right eye of the animal; the left eye of the animal was used as a control – it was treated with 0.9% NaCl.

In experimental ophthalmology, the Obenberger alkali burn is used to study the chemical injury of the cornea. Pathological processes in rabbits following an alkali injury to the cornea correspond to those in humans [22]. This model is widely used all over the world to study reparative processes in the eye and develop new methods of treatment. In our study, we reproduced this classic technique using an 8 mm filter paper disk impregnated with 2.5% sodium hydroxide (NaOH) solution. After local anesthesia with 0.4% oxybuprocaine, disk with NaOH is applied to the cornea. The exposure time is 5 s, after which the conjunctiva cavity is washed with normal saline (0.9% NaCl). The study drugs were administered depending on the distribution group and the study design 4 hours after the injury: with topical administration, instillations were performed on the surface of the cornea, 0.1 ml 8 times after 15 min; with subconjunctival administration, the injections of 0.1 ml were performed once. Animals were removed from the experiment after 24 hours in accordance with modern methods of euthanasia of laboratory animals (according to Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, of the European Parliament and the Council of the European Union, of September 22, 2010), followed by enucleation of both eye. Lethal cases were recorded during the experiment. Cases of complete damage to the eye and the absence of the possibility of taking a tissue specimen were also recorded.

In this study, we evaluate the cell landscape taking into account the specific biological activity of each subset of cells. Immunocompetent cell subsets make it possible to assess the course of the inflammatory process and predict the effect of the study drugs on the processes of corneal wound repair. The design of the experiment provided for two routes of administration – instillations on the wound surface and subconjunctival injection. The need for two routes of administration is justified by the following circumstances. To achieve pharmacological efficacy with topical administration, the molecules of the study drugs are not required to overcome the blood-ocular barrier, and this, at the first glance, is a positive aspect. However, it should be taken into account that in this experimental chemical injury the colliquative processes take place in the cornea with a damage to its morphological structure. And this, in

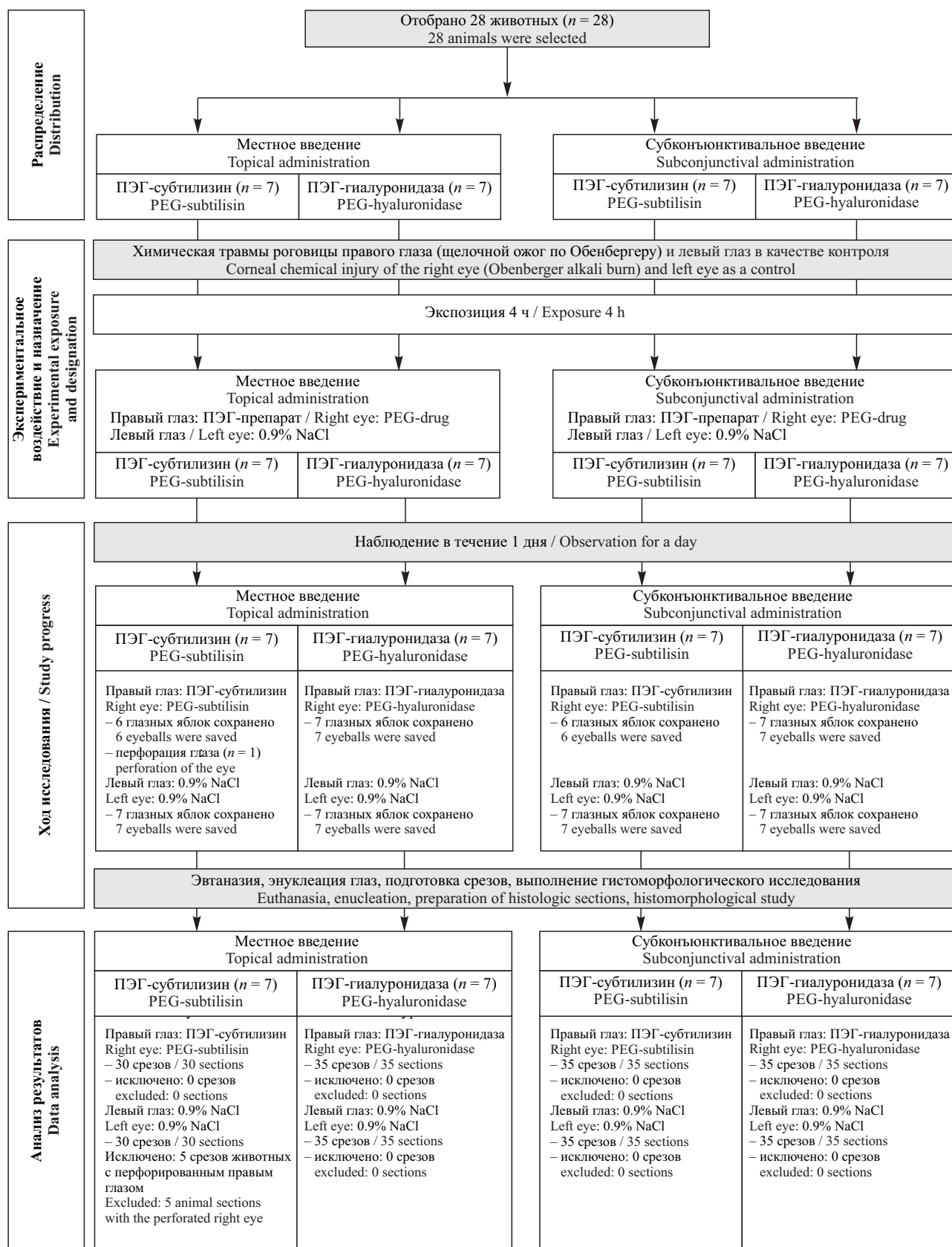


Рис. 1. Экспериментальные группы и схема исследования
Fig. 1. Experimental groups and study design

ботки новых методов лечения. В нашем исследовании мы воспроизвели эту классическую методику, используя диск фильтровальной бумаги диаметром 8 мм, пропитанный 2.5% раствором гидроксид натрия (NaOH). После местной анестезии 0.4% инокаина диск с NaOH посредством аппликации наносится на роговицу. Время экспозиции – 5 с, после чего конъюнктивальная полость промывается физиологическим раствором (0.9% NaCl). Исследуемые препараты вводились в зависимости от группы распределения и дизайна эксперимента через 4 ч после травмы: при местном введении выполнялись инстилляций на поверхность роговицы по 0.1 мл 8-кратно через 15 мин, при субконъюнктивальном – выполнены инъекции по 0.1 мл однократно. Выведение животных из эксперимента осуществлялось через 24 ч в соответствии с современными методами эвтаназии лабораторных животных (согласно Директиве 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях, Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г.) с последующей энуклеацией обоих глаз. Летальные случаи в ходе эксперимента фиксировались. Случаи полного повреждения глаза и отсутствие возможности выделения макропрепарата учитывались.

В данном исследовании мы проводим детализацию клеточного пейзажа с учетом специфической биологической активности каждой группы клеток. Популяции иммунокомпетентных клеток позволяют оценивать течение воспалительного процесса и прогнозировать воздействие изучаемых препаратов на процессы репарации роговицы. Дизайном эксперимента предусматривалось два пути введения – инстилляций на раневую поверхность и субконъюнктивальное введение. Обоснование необходимости двух способов введения обусловлено следующими обстоятельствами. При местном применении для достижения фармакологической эффективности не требуется преодоления молекулами исследуемых препаратов офтальмогематического барьера, и это, на первый взгляд, является положительным качеством. Однако следует принимать во внимание, что в данной экспериментальной химической ране имеют место быть колликвационные процессы в роговице с нарушением ее морфологической структуры. А это, в свою очередь, затрудняет диффузионные процессы лекарственных препаратов в области поврежденной ткани. Также следует учитывать эффект смывания препаратов. Субконъюнктивальное введение с учетом короткого трафика в область лимба и после-

turn, hinders the diffusion processes of drugs in the damaged tissue. The effect of washing off drugs should also be taken into account. Subconjunctival administration, in the context of a short traffic to the limbus region and subsequent diffusion into the wound from the area of intact cornea, can be considered as a tissue depot of drugs.

The biomaterial obtained was fixed in 10% neutral buffered formalin. Sections up to 5 μm thick were made on a rotary microtome, stained with hematoxylin and eosin according to the conventional method. For the preparation of histological sections, a TP1020 tissue processor (Leica, Germany), an EG1160 histombedder (Leica, Germany), a RM2235 rotary microtome (Leica, Germany), and an Autostainer XL automated slide stainer (Leica, Germany) were used. A morphometric study was performed using a grid of 121 points with a test area of $5.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ at 400 magnification. The numerical density (N_v) of inflammatory cell infiltrate and the number of cell types (neutrophils, macrophages, plasma cells, eosinophils) were calculated. Histological sections were studied using a Leica DM2500 microscope equipped with a DFC295 digital color camera (Leica, Germany). For statistical processing, a morphological examination of samples was carried out; in each section, 10 fields of view were analyzed at 400 magnification.

Statistical analysis of the data was carried out using MedCalc v. 11.3.3 (MedCalc Software), STATISTICA 8 (StatSoft, Inc.) and Microsoft Office Excel 2007. The data on the absolute cell count in sections are presented as median and quartiles. Checking the normality of the distribution of variables (the number of cells) was carried out using the Shapiro-Wilk test (for $n < 60$). For normally distributed data, the F-test was used to check the assumption of homogeneity of the variances. The Kruskal-Wallis test was performed for intergroup analysis of quantitative indicators in 3 or more groups, followed by post-hoc comparison using the Dunn test, additionally adjusted using the False Discovery Rate (FDR) calculated by the Benjamini-Hochberg method. To compare the quantitative data of two related (correlated) samples, the Wilcoxon test was used to calculate p . Contingency table analysis was used to compare binary outcomes of eye integrity after chemical injury, treatment, and completion of the follow-up period. For unrelated (non-correlated) outcomes, the Fisher's exact test was used, since the number of outcomes (n) in one of the cells of fourfold contingency table was less than 5. For related (correlated) outcomes, fourfold contingency tables were built for paired proportions, and the McNemar's test was applied with the determination of the mean p value.

дующей диффузии в рану из зоны неповрежденной роговицы может рассматриваться как тканевое депо лекарственных препаратов.

Полученный биоматериал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. На ротационном микротоме изготавливали срезы толщиной до 5 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином по стандартной методике. В работе для приготовления гистологических препаратов использовали аппарат TP1020 (Leica, Германия), станцию для заливки EG1160 (Leica, Германия), ротационный микротом RM2235 (Leica, Германия), аппарат для окрашивания микропрепаратов Autostainer XL (Leica, Германия). Морфометрическое исследование проводили с помощью сетки из 121 точки тестовой площадью 5.6×10^5 мкм² при увеличении 400. Подсчитывали численную плотность (N_A) клеток воспалительного инфильтрата, количество типов клеток (нейтрофилы, макрофаги, плазмоциты, эозинофилы). Гистологические срезы изучали на световом микроскопе Leica DM2500, оснащенном камерой DFC295 (Leica, Германия). Для статистической обработки проводилось морфологическое изучение препаратов, в каждом срезе было проанализировано по 10 полей зрения при увеличении 400.

Статистический анализ данных проведен с использованием программ MedCalc v. 11.3.3 (MedCalc Software), STATISTICA 8 (StatSoft, Inc.) и Microsoft Office Excel 2007. Данные об абсолютном количестве клеток в срезах представлены как медиана и квартили. Проверка нормальности распределения количественных признаков (количества клеток) проводилась с использованием критерия Шапиро – Уилка (для $n < 60$). Для данных, имеющих нормальное распределение, использовался F-тест для проверки предположения об однородности дисперсий. Выполнен тест Краскала – Уоллиса для межгруппового анализа количественных показателей в 3 и более группах с последующим апостериорным сравнением с помощью теста Данна, дополнительно скорректированного с помощью коэффициента ложных открытий (FDR) Бенджамини – Хохберга. Для сравнения количественных данных двух связанных (коррелирующих) выборок использовали тест Вилкоксона с нормальной аппроксимацией для расчета p . Для сравнения бинарных исходов целостности глазного яблока после химической травмы, применения терапии и завершения периода наблюдения применялся анализ таблиц сопряженности. Для несвязанных (некоррелирующих) исходов использован точный тест Фишера, так как число исходов (n) в одной из ячеек четырехпольной

Statistical hypotheses were considered confirmed at $p < 0.05$, for post-hoc comparisons at $p < 0.0125$.

RESULTS

There were no cases of non-survival to euthanasia. Among the study groups, no effect of the therapy for chemical eye injury on the frequency of corneal perforations was revealed (Fischer's exact test – 1.0). In the topical PEG-subtilisin administration group, the injection of PEG-subtilisin did not increase the incidence of corneal perforations compared with the administration of 0.9% NaCl (McNemar's mean $p = 0.5$).

The total number of cells (Fig. 2) in the groups of topical and subconjunctival administration of PEG-subtilisin was 43 (40; 52) and 73 (33; 92), respectively, and 46 (37; 61) with subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase which turned out to be higher than cell numbers with 0.9% NaCl treatment in these groups ($p < 0.01$) and higher ($p < 0.0001$) cell numbers than in the topical PEG-hyaluronidase administration group. The total number of cells in topical administration of PEG-hyaluronidase was 15 (13; 16) versus topical application of 0.9% NaCl – 15 (14; 18) in this group ($p = 0.38$). The number of neutrophils in case of PEG-subtilisin was 1 (1; 2) with topical and 0 (0; 1) with subconjunctival administration, and in case of PEG-hyaluronidase 0 (0; 0) both with topical and subconjunctival route of administration (Table 1).

On Fig. 2 we see an increase in the total count of immunocompetent cells in eye tissues following the topical and subconjunctival administration of PEG-subtilisin and subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase compared with 0.9% NaCl ($p < 0.05$) in corneal chemical injury. Topical administration of PEG-hyaluronidase showed no pronounced cellular response to chemical injury to the eye compared with topical and subconjunctival administration of PEG-subtilisin and subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase ($p < 0.0001$). With topical administration of PEG-hyaluronidase, the cellular response does not differ in comparison with the control (NaCl 0.9%).

On Fig. 3 we can see the effect of the studied drugs on the lymphocyte count in the eye tissues. PEG-subtilisin instillations did not cause an increase in the number of lymphocytes in the eye tissue (no difference compared to the control group – 0.9% NaCl, $p = 0.3$). Topical administration of PEG-hyaluronidase reduces the response of lymphocytes to chemical injury to the eye compared with the control group – 0.9% NaCl ($p < 0.0001$) and compared with all experimental groups ($p < 0.0001$). With subconjunctival administration of PEG-subtilisin and PEG-

таблицы было меньше 5. Для связанных (коррелирующих) исходов построены четырехпольные таблицы для парных пропорций и применен критерий МакНемара с определением среднего значения p . Статистические гипотезы считались подтвержденными при уровне значимости $p < 0.05$, для апостериорных сравнений при $p < 0.0125$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Случаев недожития до эвтаназии не зафиксировано. Среди групп исследования не выявлено влияние проводимой терапии при химической травме глаза на частоту перфораций глаза (точный тест Фишера – 1.0). В группе «Местное введение ПЭГ-субтилизина» введение ПЭГ-субтилизина не повлияло на увеличение частоты перфораций глаза по сравнению с введением 0.9% NaCl (среднее p по МакНемару – 0.5).

Общее количество клеток (рис. 2) в группах местного и субконъюнктивального применения ПЭГ-субтилизина составило 43 (40; 52) и 73 (33; 92) соответственно, а субконъюнктивального применения ПЭГ-гиалуронидазы – 46 (37; 61), что оказалось выше количества клеток при применении 0.9% NaCl в этих группах ($p < 0.01$) и выше ($p < 0.0001$) количества клеток в группе местного применения ПЭГ-гиалуронидазы. Общее количество клеток при местном введении ПЭГ-гиалуронидазы составило 15 (13; 16) против местного применения 0.9% NaCl – 15 (14; 18) в данной группе ($p = 0.38$). Количество нейтрофилов при применении ПЭГ-субтилизина составило 1 (1; 2) при местном и 0 (0; 1) при субконъюнктивальном применении, а при применении ПЭГ-гиалуронидазы 0 (0; 0) как при местном, так и субконъюнктивальном пути введения (табл. 1).

На рис. 2 показано увеличение общего количества иммунокомпетентных клеток в тканях глаза после местного и субконъюнктивального применения ПЭГ-субтилизина и субконъюнктивального применения ПЭГ-гиалуронидазы по сравнению с 0.9% NaCl ($p < 0.05$) при химической травме роговицы. При местном введении ПЭГ-гиалуронидазы нет выраженной клеточной реакции в ответ на химическую травму глаза по сравнению с местным и субконъюнктивальным применением ПЭГ-субтилизина и субконъюнктивальным применением ПЭГ-гиалуронидазы ($p < 0.0001$). При местном введении ПЭГ-гиалуронидазы клеточный ответ по сравнению с контролем (NaCl 0.9%) не отличается.

На рис. 3 представлено влияние изучаемых препаратов на содержание лимфоцитов в тканях глаза. Инстилляцией ПЭГ-субтилизина не вызы-

hyaluronidase, the response of lymphocytes was more pronounced compared with topical administration ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively) and the control ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively).

As can be seen from Fig. 4, both study drugs increase the plasma cell count ($p = 0.01$ for the group of topical administration of PEG-subtilisin, and $p < 0.0001$ for the rest groups compared with the corresponding control group – 0.9% NaCl). With subconjunctival administration of PEG-subtilisin and PEG-hyaluronidase, a larger plasma cell pool is formed compared with topical administration of the drugs ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively).

Topical and subconjunctival administration of PEG-subtilisin, as well as subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase, causes an expressed migration of eosinophils from blood flow (Fig. 5) compared with control groups ($p = 0.008$ compared with the group of topical administration of PEG-subtilisin and $p < 0.0001$ compared with the corresponding other experimental groups). This effect is most expressed with subconjunctival use of PEG-subtilisin. Topical administration of PEG-hyaluronidase not only does not cause such an effect ($p < 0.0001$ compared with other experimental groups), moreover, the eosinophil count is 2 times less than when using 0.9% NaCl ($p < 0.0001$).

The use of PEG-hyaluronidase and PEG-subtilisin topically and subconjunctivally causes an increase in the macrophage count (Fig. 6) compared with the use of 0.9% NaCl ($p = 0.004$ and $p < 0.0001$, respectively). The greatest manifestation of this effect is observed with the subconjunctival administration of PEG-subtilisin ($p < 0.0001$ compared with topical administration of PEG-subtilisin, and $p = 0.0001$ and $p = 0.005$ compared with topical and subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase, respectively). Topical administration of PEG-hyaluronidase does not cause this effect ($p < 0.0001$ compared with other experimental groups and $p = 0.0009$ compared with 0.9% NaCl).

The neutrophil count in the administration of PEG-subtilisin was 1 (1; 2) with topical and 0 (0; 1) with subconjunctival, and with the use of PEG-hyaluronidase 0 (0; 0) both with topical and subconjunctival route of administration (see Table 1). Analysis of these data revealed that PEG-subtilisin instillations lead to a significant increase in the neutrophil count (Fig. 7) compared with the administration of 0.9% NaCl ($p = 0.01$) and topical and subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase ($p < 0.0001$ and $p = 0.0007$, respectively). With topical administration of PEG-subtilisin, this effect is more pronounced ($p < 0.0001$ compared with its subconjunc-

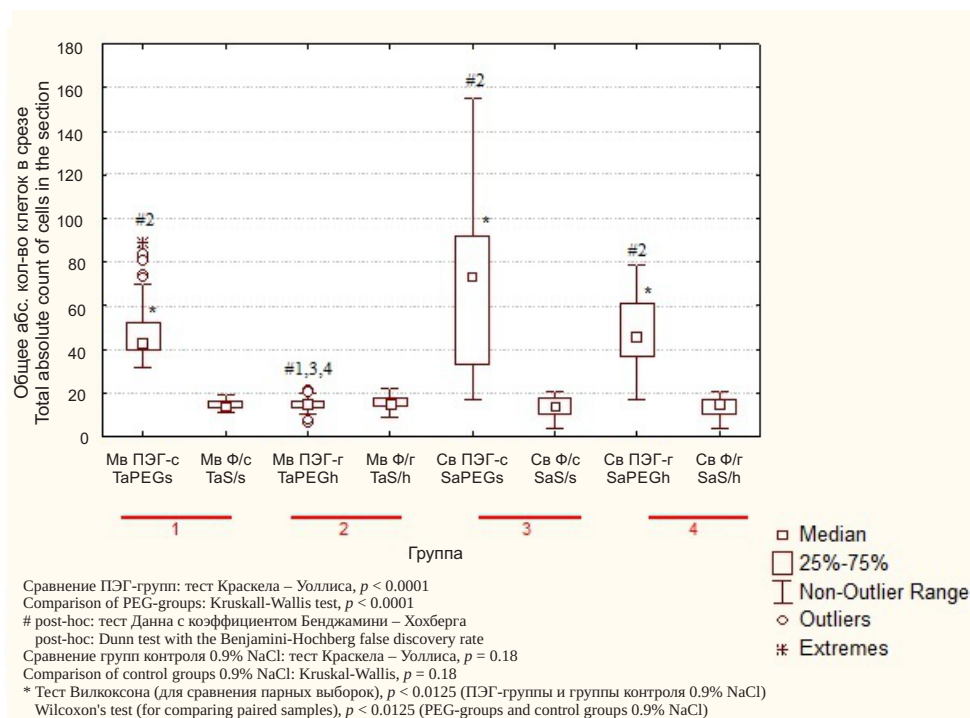


Рис. 2. Общее количество иммунокомпетентных клеток в области химической травмы роговицы после введения изучаемых препаратов (1 – группа «Местное введение ПЭГ-субтилизина»; 2 – группа «Местное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; 3 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина»; 4 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; Мв ПЭГ-с – местное введение ПЭГ-субтилизина; Мв Ф/с – местное введение 0.9% NaCl в группе 1; Мв ПЭГ-г – местное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Мв Ф/г – местное введение 0.9% NaCl в группе 2; Св ПЭГ-с – субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина; Св Ф/с – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 3; Св ПЭГ-г – субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Св Ф/г – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 4)

Fig. 2. The total number of immunocompetent cells in the area of the corneal chemical injury after administration of the study drugs (1 – topical PEG-subtilisin administration group; 2 – topical PEG-hyaluronidase administration group; 3 – subconjunctival PEG-subtilisin administration group; 4 – subconjunctival PEG-hyaluronidase administration group; ТаPEGs – topical administration of PEG-subtilisin; ТаS/s – topical administration of 0.9% NaCl in group 1; ТаPEGh – topical administration of PEG-hyaluronidase; ТаS/h – topical administration of 0.9% NaCl in group 2; СаPEGs – subconjunctival administration of PEG-subtilisin; СаS/s – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 3; СаPEGh – subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase; СаS/h – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 4)

вают роста количества лимфоцитов в ткани глаза (нет отличий по сравнению с контрольной группой – 0.9% NaCl, $p = 0.3$). Местное применение ПЭГ-гиалуронидазы уменьшает лимфоцитарный ответ на химическую травму глаза по сравнению с контрольной группой – 0.9% NaCl ($p < 0.0001$) и по сравнению со всеми экспериментальными группами ($p < 0.0001$). При субконъюнктивальном применении ПЭГ-субтилизина и ПЭГ-гиалуронидазы лимфоцитарный ответ выражен сильнее по сравнению с местным применением ($p < 0.0001$ и $p < 0.0001$ соответственно) и контролем ($p < 0.0001$ и $p < 0.0001$ соответственно).

Как видно из рис. 4, оба изучаемых препарата увеличивают содержание плазмоцитов ($p = 0.01$ для группы «Местное введение ПЭГ-субтилизина» и $p < 0.0001$ для остальных групп по сравнению с соответствующей контрольной группой).

tival injection). The results of the use of PEG-hyaluronidase and 0.9% NaCl are comparable (no differences: $p = 0.22$ for local administration and $p = 0.36$ for subconjunctival one).

DISCUSSION

PEG-subtilisin, regardless of the route of its administration, and PEG-hyaluronidase in subconjunctival injections leads to an increase in the immunocompetent cell count in the area of the corneal chemical injury compared with administration of 0.9% NaCl (see Fig. 2). With PEG-subtilisin instillation and subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase, the immunocompetent cell count in the area of the corneal chemical injury increases by 3.5 times, and with subconjunctival administration of PEG-subtilisin, by 5 times (see Fig. 2). Characteristically, subconjunctival administration has a great

Таблица 1. Численная плотность (Na) и клеточный состав химической раны роговицы после введения ПЭГ-субтилизины и ПЭГ-гиалуронидазы, Ме (25 %; 75 %) **Table 1.** Numerical density (Na) and cellular composition of the chemical injury to the cornea following the injection of PEG-subtilisin and PEG-hyaluronidase, Me (25%; 75%)

Группа (количество животных) Group (number of animals)	Терапия (количество срезов) Therapy (number of sections)	Морфологический вид клеток / Morphological type of cells					Общее количество клеток Total number of cells
		лимфоциты lymphocytes	плазмоциты plasma cells	макрофаги macrophages	эозинофилы eosinophils	нейтрофилы neutrophils	
1. Местное введение ПЭГ-субтилизины (n = 7) Topical administration of PEG-subtilisin	Правый глаз (n = 30) ПЭГ-субти- лизин Right eye (n = 30) PEG-subtilisin	6 (5; 7) ^{#2,3,4}	12 (11; 15) [*]	2 (1; 2) ^{#2,3,*}	22.5 (21; 27) ^{#2,4,*}	1 (1; 2) ^{#2,3,4,*}	43 (40; 52) ^{#2,*}
	Левый глаз (n = 30) 0.9% NaCl Left eye (n = 30) 0.9% NaCl	6 (4; 7) ^{†3,4}	5 (4; 7)	1 (1; 1)	3 (1; 3)	0 (0; 0)	14 (13; 16)
	Правый глаз (n = 35) ПЭГ-гиалуро- нидаза Right eye (n = 35) PEG-hyaluronidase	3 (2; 4) ^{#1,3,4,*}	11 (9; 12) ^{#3,4,*}	1 (0; 1) ^{#1,3,4,*}	1 (0; 1) ^{#1,3,4,*}	0 (0; 0) ^{#1,3}	15 (13; 16) ^{#1,3,4}
2. Местное введение ПЭГ-гиалуронидазы (n = 7) Topical administration of PEG-hyaluronidase	Левый глаз (n = 35) 0.9% NaCl Left eye (n = 35) 0.9% NaCl	5 (4; 7) ^{†3,4}	6 (4; 8)	1 (1; 1)	3 (2; 4)	0 (0; 0)	15 (14; 18)
	Правый глаз (n = 35) ПЭГ-субти- лизин Right eye (n = 35) PEG-subtilisin	9 (6; 16) ^{#1,2,*}	17 (8; 29) ^{#2,*}	4 (2; 9) ^{#1,2,4,*}	33 (16; 44) ^{#2,4,*}	0 (0; 1) ^{#1,2,4,*}	73 (33; 92) ^{#2,*}
	Левый глаз (n = 35) 0.9% NaCl Left eye (n = 35) 0.9% NaCl	4 (2; 5) ^{†2}	6 (5; 7)	1 (0; 2)	3 (2; 4)	0 (0; 0)	13.5 (10; 18)
3. Субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизины (n = 7) Subconjunctival administra- tion of PEG-subtilisin	Правый глаз (n = 35) ПЭГ-гиалу- ронидаза Right eye (n = 35) PEG-hyaluronidase	9 (5.5; 12) ^{#1,2,*}	15.5 (12; 22) ^{#2,*}	2 (1; 3) ^{#2,3,*}	18 (15; 21.5) ^{#1,2,3,*}	0 (0; 0) ^{#1,3;}	46 (37; 61) ^{#2,*}
	Левый глаз (n = 35) 0.9% NaCl Left eye (n = 35) 0.9% NaCl	3.5 (2; 5) ^{†2}	6 (5; 8)	1 (0; 2)	3 (3; 4)	0 (0; 0)	14.5 (10; 17)
	Сравнение влияния ПЭГ-субтилизины и ПЭГ-гиалуронидазы в группах исследования [#] Comparison of the impacts of PEG-subtilisin and PEG-hyaluronidase in study groups [#]	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001
Сравнение влияния 0.9% NaCl в группах исследования [†] Comparison of the impacts of 0.9% NaCl in study groups [†]		p < 0.0001	p = 0.96	p = 0.92	p = 0.25	p = 0.79	p = 0.18

[#] † Тест Краскела – Уоллиса; post-hoc: тест Данна с коэффициентом Бенджамини – Хохберга (FDR), $p < 0.0125$.

* Тест Вилкоксона (для сравнения парных выборок), $p < 0.0125$.

Wilcoxon's test (to compare paired samples), $p < 0.0125$.

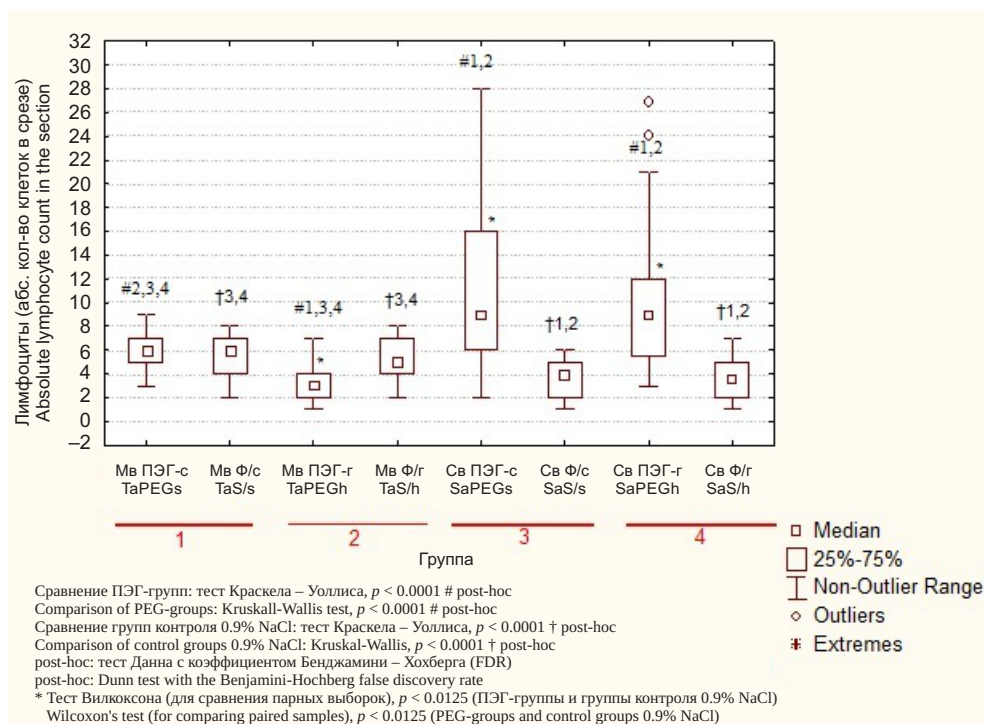


Рис. 3. Количество лимфоцитов в области химической травмы роговицы после введения изучаемых препаратов (1 – группа «Местное введение ПЭГ-субтилизина»; 2 – группа «Местное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; 3 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина»; 4 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; Мв ПЭГ-с – местное введение ПЭГ-субтилизина; Мв Ф/с – местное введение 0.9% NaCl в группе 1; Мв ПЭГ-г – местное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Мв Ф/г – местное введение 0.9% NaCl в группе 2; Св ПЭГ-с – субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина; Св Ф/с – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 3; Св ПЭГ-г – субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Св Ф/г – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 4)

Fig. 3. The lymphocyte count in the area of the corneal chemical injury after administration of the study drugs (1 – topical PEG-subtilisin administration group; 2 – topical PEG-hyaluronidase administration group; 3 – subconjunctival PEG-subtilisin administration group; 4 – subconjunctival PEG-hyaluronidase administration group; TaPEGs – topical administration of PEG-subtilisin; TaS/s – topical administration of 0.9% NaCl in group 1; TaPEGh – topical administration of PEG-hyaluronidase; TaS/h – topical administration of 0.9% NaCl in group 2; SaPEGs – subconjunctival administration of PEG-subtilisin; SaS/s – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 3; SaPEGh – subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase; SaS/h – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 4)

пой – 0.9% NaCl). При субконъюнктивальном введении ПЭГ-субтилизина и ПЭГ-гиалуронидазы формируется больший пул плазмочитов по сравнению с местным применением препаратов ($p < 0.0001$ и $p < 0.0001$ соответственно).

Местное и субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина, а также субконъюнктивальное применение ПЭГ-гиалуронидазы вызывает выраженную миграцию эозинофилов из кровотока (рис. 5) по сравнению с контрольными группами ($p = 0.008$ по сравнению с группой «Местное применение ПЭГ-субтилизина» и $p < 0.0001$ по сравнению с соответствующими другими экспериментальными группами). Наиболее выраженное проявление данного эффекта отмечается при субконъюнктивальном применении ПЭГ-субтилизина. Местное применение ПЭГ-гиалу-

stimulating effect on cell migration to the wound. The route of 0.9% NaCl administration has virtually no influence on cell migration. Thus, subconjunctival administration of the study drugs provides a tissue depot with a prolonged pharmacological effect.

When instilled on the wound surface, the study drugs virtually do not increase the lymphocyte count compared to the control, and subconjunctival administration of both enzymes increases their count by more than 2 times (see Fig. 3). At the same time, there is no difference between the drugs in terms of the effect on lymphocyte count. The fact of accumulation of lymphocytes is of positive importance, since these cells of the MALT system are endowed with immune memory without marked effects of alteration on tissues. Their presence in the area of tissue degeneration will provide antimi-

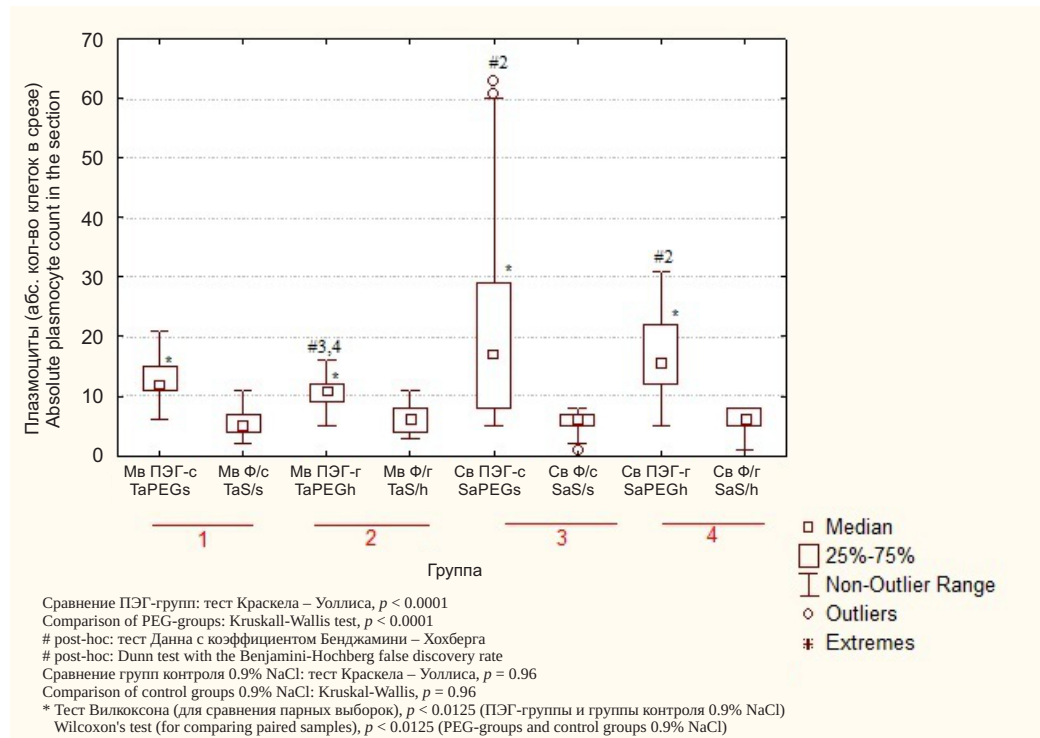


Рис. 4. Количество плазматических клеток в области химической травмы роговицы после введения изучаемых препаратов (1 – группа «Местное введение ПЭГ-субтилизины»; 2 – группа «Местное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; 3 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизины»; 4 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; Мв ПЭГ-с – местное введение ПЭГ-субтилизины; Мв Ф/с – местное введение 0.9% NaCl в группе 1; Мв ПЭГ-г – местное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Мв Ф/г – местное введение 0.9% NaCl в группе 2; Св ПЭГ-с – субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизины; Св Ф/с – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 3; Св ПЭГ-г – субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Св Ф/г – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 4)

Fig. 4. The plasma cell count in the area of the corneal chemical injury after administration of the study drugs (1 – topical PEG-subtilisin administration group; 2 – topical PEG-hyaluronidase administration group; 3 – subconjunctival PEG-subtilisin administration group; 4 – subconjunctival PEG-hyaluronidase administration group; TaPEGs – topical administration of PEG-subtilisin; TaS/s – topical administration of 0.9% NaCl in group 1; TaPEGh – topical administration of PEG-hyaluronidase; TaS/h – topical administration of 0.9% NaCl in group 2; SaPEGs – subconjunctival administration of PEG-subtilisin; SaS/s – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 3; SaPEGh – subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase; SaS/h – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 4)

ронидазы не только не вызывает такого эффекта ($p < 0.0001$ по сравнению с другими экспериментальными группами), более того, количество эозинофилов в 2 раза меньше, чем при применении 0.9% NaCl ($p < 0.0001$).

Применение ПЭГ-гиалуронидазы субконъюнктивально и ПЭГ-субтилизины субконъюнктивально вызывает увеличение количества макрофагов (рис. 6) по сравнению с применением 0.9% NaCl ($p = 0.004$ и $p < 0.0001$ соответственно). Наибольшее проявление данного эффекта наблюдается при субконъюнктивальном введении ПЭГ-субтилизины ($p < 0.0001$ по сравнению с местным применением ПЭГ-субтилизины и $p = 0.0001$ и $p = 0.005$ по сравнению с местным и субконъюнктивальным применением ПЭГ-гиалуронидазы соответственно). Местное применение

антибактериальных и противовоспалительных эффектов, которые в конечном итоге не будут препятствовать регенерации травмированной роговицы.

Независимо от способа введения обоих препаратов, они увеличивают количество плазматических клеток в 2–3 раза по сравнению с 0.9% NaCl (см. рис. 4). Увеличение количества плазматических клеток может обеспечить локальную реализацию приобретенного иммунитета, который также следует рассматривать как положительный эффект.

Оба способа введения ПЭГ-субтилизины приводят к выраженной эозинофилии. ПЭГ-гиалуронидаза увеличивает количество эозинофилов только при субконъюнктивальном введении (см. рис. 5). Вероятно, что присутствие препарата с большими молекулами приводит к быстрой миграции эозинофилов из кровеносных сосудов. Это довольно тревожащее обстоятельство для субтилизины, поскольку эозинофилы способны к экстраклеточному цитолизу и стиму-

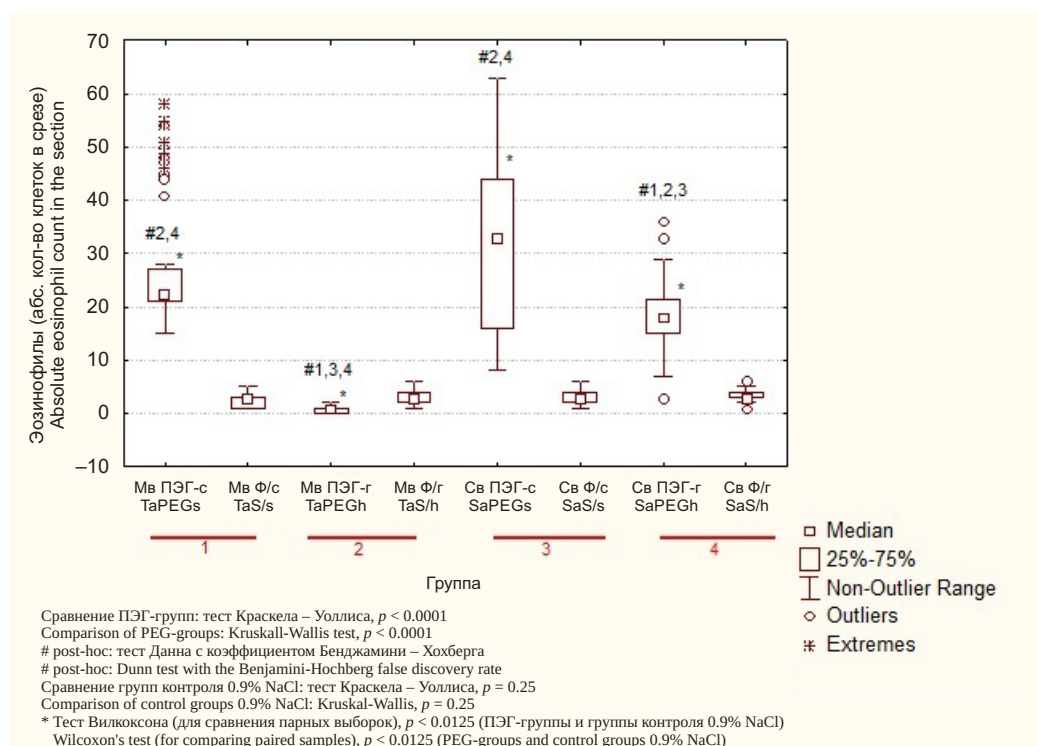


Рис. 5. Количество эозинофилов в области химической травмы роговицы после введения изучаемых препаратов (1 – группа «Местное введение ПЭГ-субтилизина»; 2 – группа «Местное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; 3 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина»; 4 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; Мв ПЭГ-с – местное введение ПЭГ-субтилизина; Мв Ф/с – местное введение 0.9% NaCl в группе 1; Мв ПЭГ-г – местное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Мв Ф/г – местное введение 0.9% NaCl в группе 2; Св ПЭГ-с – субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина; Св Ф/с – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 3; Св ПЭГ-г – субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Св Ф/г – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 4)

Fig. 5. The eosinophil count in the area of the corneal chemical injury after administration of the study drugs (1 – topical PEG-subtilisin administration group; 2 – topical PEG-hyaluronidase administration group; 3 – subconjunctival PEG-subtilisin administration group; 4 – subconjunctival PEG-hyaluronidase administration group; TaPEGs – topical administration of PEG-subtilisin; TaS/s – topical administration of 0.9% NaCl in group 1; TaPEGh – topical administration of PEG-hyaluronidase; TaS/h – topical administration of 0.9% NaCl in group 2; SaPEGs – subconjunctival administration of PEG-subtilisin; SaS/s – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 3; SaPEGh – subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase; SaS/h – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 4)

ние ПЭГ-гиалуронидазы не вызывает данного эффекта ($p < 0.0001$ по сравнению с другими экспериментальными группами и $p = 0.0009$ по сравнению с 0.9% NaCl).

Количество нейтрофилов при применении ПЭГ-субтилизина составило 1 (1; 2) при местном и 0 (0; 1) при субконъюнктивальном применении, а при применении ПЭГ-гиалуронидазы 0 (0; 0) как при местном, так и субконъюнктивальном пути введения (см. табл. 1). Анализ этих данных выявил, что инстилляций ПЭГ-субтилизина приводят к достоверному увеличению числа нейтрофилов (рис. 7) по сравнению с введением 0.9% NaCl ($p = 0.01$) и местным и субконъюнктивальным введением ПЭГ-гиалуронидазы ($p < 0.0001$ и $p = 0.0007$ соответственно). При местном применении ПЭГ-субтилизина данный эффект проявля-

ние фибробластов. From this point of view, the administration of PEG-hyaluronidase can be considered safe only in the form of instillations.

A marked effect of macrophage accumulation is observed only with subconjunctival administration of PEG-subtilisin (see Fig. 6). The migration of macrophages to the area of damage is aimed at primary phagocytosis, local production of nitric oxide from arginine, and enhancement of endothelial repair and angiogenesis. From this position, the effect of subconjunctival administration of PEG-subtilisin can be considered positive.

The use of PEG-hyaluronidase does not affect the migration of neutrophils when administered topically. PEG-subtilisin slightly increases the migration of neutrophils (see Fig. 7). Neutrophils are able to realize oxidative stress/respiratory burst with the release of a

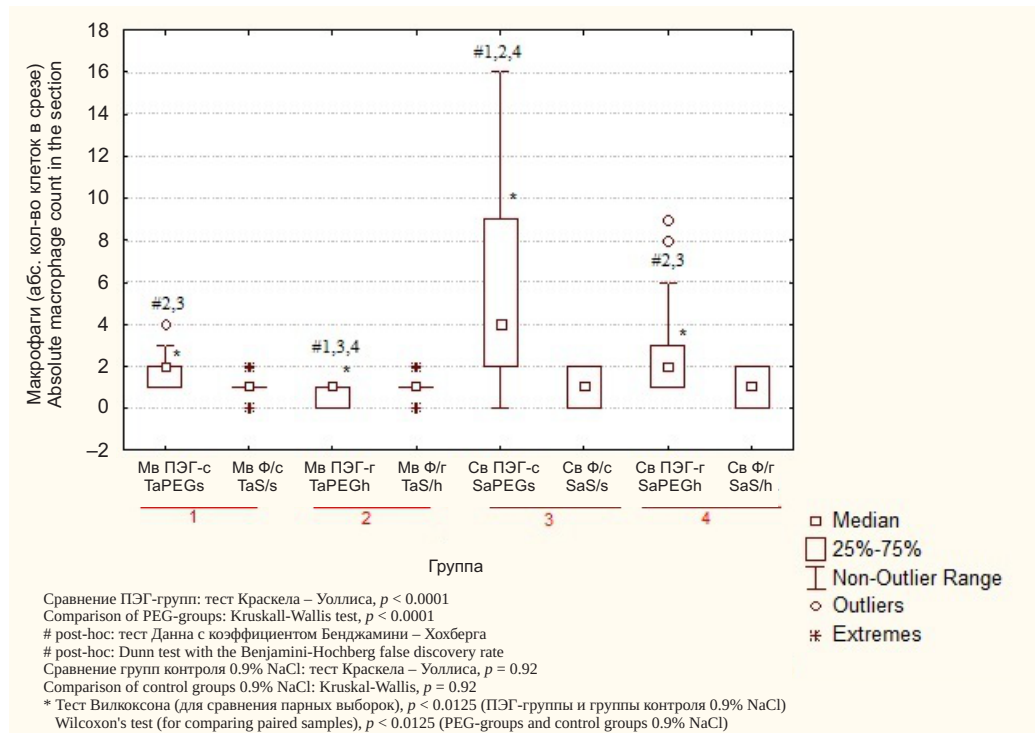


Рис. 6. Количество макрофагов в области химической травмы роговицы после введения изучаемых препаратов (1 – группа «Местное введение ПЭГ-субтилизины»; 2 – группа «Местное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; 3 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизины»; 4 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; Мв ПЭГ-с – местное введение ПЭГ-субтилизины; Мв Ф/с – местное введение 0.9% NaCl в группе 1; Мв ПЭГ-г – местное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Мв Ф/г – местное введение 0.9% NaCl в группе 2; Св ПЭГ-с – субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизины; Св Ф/с – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 3; Св ПЭГ-г – субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Св Ф/г – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 4)

Fig. 6. The macrophage count in the area of the corneal chemical injury after administration of the study drugs (1 – topical PEG-subtilisin administration group; 2 – topical PEG-hyaluronidase administration group; 3 – subconjunctival PEG-subtilisin administration group; 4 – subconjunctival PEG-hyaluronidase administration group; TaPEGs – topical administration of PEG-subtilisin; TaS/s – topical administration of 0.9% NaCl in group 1; TaPEGh – topical administration of PEG-hyaluronidase; TaS/h – topical administration of 0.9% NaCl in group 2; SaPEGs – subconjunctival administration of PEG-subtilisin; SaS/s – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 3; SaPEGh – subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase; SaS/h – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 4)

ется сильнее ($p < 0.0001$ по сравнению с субконъюнктивальным его введением). Результаты введения ПЭГ-гиалуронидазы и 0.9% NaCl сопоставимы (нет отличий: $p = 0.22$ для местного применения и $p = 0.36$ для субконъюнктивального).

ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие ПЭГ-субтилизины независимо от пути его введения и ПЭГ-гиалуронидазы при субконъюнктивальном пути введения приводит к увеличению числа иммунокомпетентных клеток в области химической раны роговицы по сравнению с введением 0.9% NaCl (см. рис. 2). При инстиляции ПЭГ-субтилизины и субконъюнктивальном применении ПЭГ-гиалуронидазы количество иммунокомпетентных клеток в области химической раны роговицы увеличивается в

large amount of reactive oxygen species, and also have significant phagocytosis potential. Their presence in a corneal wound may have an adverse after-effect due to alteration of intact cells of the wound. Arguing from the standpoint of the effect of cytotoxicity on the cell subpopulation of the wound, the absence of the effect of enhancing neutrophil migration by the studied preparations, should be considered as a positive phenomenon, especially for PEG-hyaluronidase.

CONCLUSION

Administration of PEG-hyaluronidase subconjunctivally and PEG-subtilisin both topically and subconjunctivally leads to increased migration of immunocompetent cells to the area of the corneal chemical injury, while the neutrophil migration is insignificant. It is completely absent when PEG-hyal-

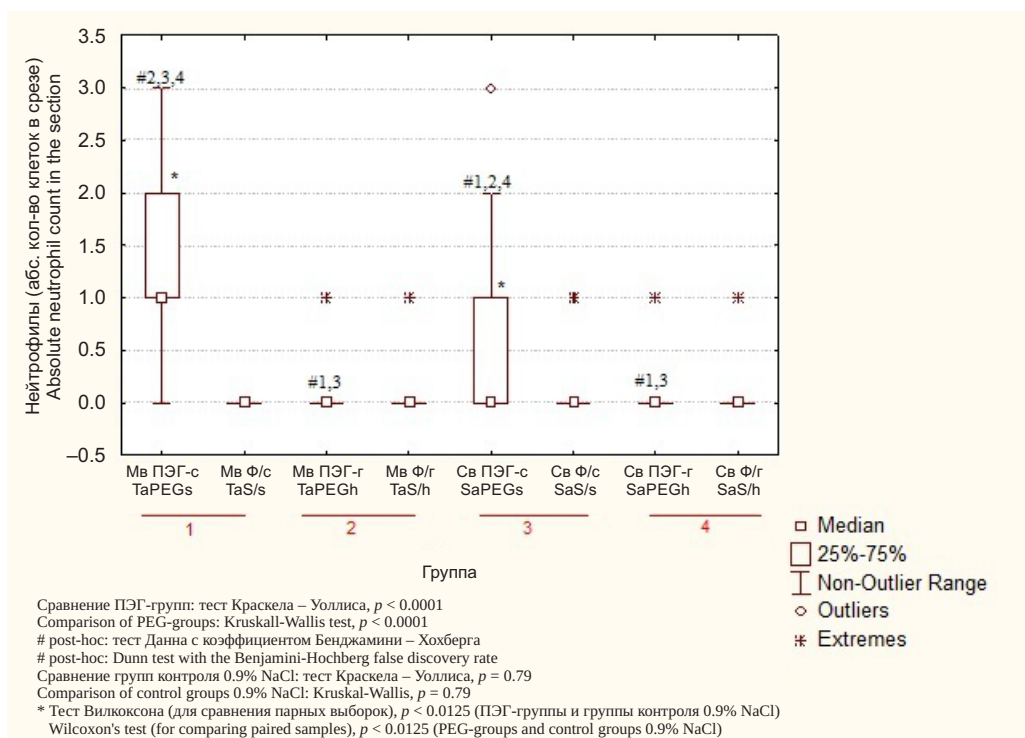


Рис. 7. Количество нейтрофилов в области химической травмы роговицы после введения изучаемых препаратов (1 – группа «Местное введение ПЭГ-субтилизина»; 2 – группа «Местное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; 3 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина»; 4 – группа «Субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы»; Мв ПЭГ-с – местное введение ПЭГ-субтилизина; Мв Ф/с – местное введение 0.9% NaCl в группе 1; Мв ПЭГ-г – местное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Мв Ф/г – местное введение 0.9% NaCl в группе 2; Св ПЭГ-с – субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина; Св Ф/с – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 3; Св ПЭГ-г – субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; Св Ф/г – субконъюнктивальное введение 0.9% NaCl в группе 4)

Fig. 7. The neutrophil count in the area of the corneal chemical injury after administration of the study drugs (1 – topical PEG-subtilisin administration group; 2 – topical PEG-hyaluronidase administration group; 3 – subconjunctival PEG-subtilisin administration group; 4 – subconjunctival PEG-hyaluronidase administration group; TaPEGs – topical administration of PEG-subtilisin; TaS/s – topical administration of 0.9% NaCl in group 1; TaPEGh – topical administration of PEG-hyaluronidase; TaS/h – topical administration of 0.9% NaCl in group 2; SaPEGs – subconjunctival administration of PEG-subtilisin; SaS/s – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 3; SaPEGh – subconjunctival administration of PEG-hyaluronidase; SaS/h – subconjunctival administration of 0.9% NaCl in group 4)

3.5 раза, а при субконъюнктивальном введении ПЭГ-субтилизина – в 5 раз (см. рис. 2). Характерно, что субконъюнктивальное введение обладает большим стимулирующим влиянием на миграцию клеток в область раны. На эффект миграции клеток путь введения 0.9% NaCl практически не оказывает влияния. Таким образом, субконъюнктивальное введение исследуемых препаратов обеспечивает тканевое депо с пролонгированным фармакологическим воздействием.

При инстиляции на поверхность раны исследуемые препараты практически не увеличивают количество лимфоцитов по сравнению с контролем, а субконъюнктивальное введение обоих ферментов увеличивает их количество более чем в 2 раза (см. рис. 3). При этом по влиянию на число лимфоцитов между препаратами разницы нет.

uronidase is used subconjunctivally which characterizes this therapy regimen as safer and more effective in chemical injury of the cornea due to the absence of intact cell alteration.

Topical administration of PEG-hyaluronidase does not cause an expressed cellular response of immunocompetent cells in the area of the chemical injury of the cornea, and the effect is comparable to the use of 0.9% NaCl which differs from the effect of PEG-subtilisin and PEG-hyaluronidase administered subconjunctivally. The absence of its pharmacological effect when applied topically characterizes the safety profile of PEG-hyaluronidase for this route of administration.

The use of PEG-subtilisin subconjunctivally causes a pronounced response of immunocompetent cells which may be unsafe given the proteolytic effect of the drug.

Факт накопления лимфоцитов имеет позитивное значение, поскольку эти клетки MALT-системы наделены иммунной памятью без выраженных эффектов альтерации на ткани. Их присутствие в зоне тканевой дегенерации будет обеспечивать антимикробное и противовоспалительное действие, что в итоге не будет сдерживать процессы регенерации поврежденной роговицы.

Независимо от пути введения обоих препаратов они в 2–3 раза увеличивают содержание плазмочитов по сравнению 0.9% NaCl (см. рис. 4). Рост количества плазмочитов может обеспечивать локальную реализацию приобретенного иммунитета, что также следует расценивать как положительный факт.

Оба пути введения ПЭГ-субтилизина приводят к выраженной эозинофилии. ПЭГ-гиалуронидаза увеличивает содержание эозинофилов только при субконъюнктивальном введении (см. рис. 5). Вероятно, факт присутствия крупномолекулярного препарата приводит к быстрой миграции эозинофилов из кровеносных сосудов. Это достаточно тревожно выглядит в отношении субтилизина, поскольку эозинофилы способны к внеклеточному цитолизу и стимуляции фибробластов. С этой точки зрения и введение ПЭГ-гиалуронидазы можно считать безопасным только в виде инстилляций.

Выраженный эффект накопления макрофагов отмечается только при субконъюнктивальном введении ПЭГ-субтилизина (см. рис. 6). Миграция макрофагов в зону повреждения имеет цель осуществить первичный фагоцитоз, местную продукцию оксида азота из аргинина, усилить репарацию эндотелия и ангиогенез. С этой позиции эффект субконъюнктивального введения ПЭГ-субтилизина можно считать положительным.

Применение ПЭГ-гиалуронидазы не оказывают влияния на миграцию нейтрофилов при местном введении. ПЭГ-субтилизин незначительно увеличивает миграцию нейтрофилов (см. рис. 7). Нейтрофилы способны реализовывать оксидантный стресс/респираторный взрыв с выходом большого количества активных форм кислорода, а также обладают выраженным фагоцитозом. Их присутствие в ране роговицы может иметь неблагоприятное последствие из-за альтерации неповрежденных клеток раны. Рассуждая с позиции влияния цитотоксичности на клеточный массив раны, отсутствие воздействия исследуемых препаратов на усиление миграции нейтрофилов следует считать положительным эффектом, особенно в отношении ПЭГ-гиалуронидазы.

Author contribution to the writing of the paper (performing of experimental work – V.E. Zabanova, K.I. Ershov, G.I. Baikarov; writing the paper – P.G. Madonov; editing the paper – A.Zh. Fursova, A.P. Nadeev, P.G. Madonov; development of the study design – P.G. Madonov, N.P. Leonov; statistical data analysis, paper design – V.E. Zabanova, G.I. Baikarov).

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение ПЭГ-гиалуронидазы субконъюнктивально и ПЭГ-субтилизина как местно, так и субконъюнктивально приводит к усиленной миграции иммунокомпетентных клеток в зону химического повреждения роговицы, при этом миграция нейтрофилов незначительна. Она полностью отсутствует при применении ПЭГ-гиалуронидазы субконъюнктивально, что характеризует данную схему терапии как более безопасную и эффективную при химической травме роговицы из-за отсутствия альтерации неповрежденных клеток.

Местное применение ПЭГ-гиалуронидазы не вызывает выраженного клеточного ответа иммунокомпетентных клеток в области химической раны роговицы, а эффект сравним с применением 0.9% NaCl, что отличается от эффекта ПЭГ-субтилизина и ПЭГ-гиалуронидазы, введенных субконъюнктивально. Отсутствие ее фармакологического эффекта при местном применении характеризует профиль безопасности ПЭГ-гиалуронидазы при данном типе введения.

Применение ПЭГ-субтилизина при субконъюнктивальном пути введения вызывает выраженный ответ иммунокомпетентных клеток, что может быть небезопасно, учитывая протеолитическое действие препарата.

Вклад в написание статьи (проведение экспериментальных работ – В.Е. Забанова, К.И. Ершов, Г.И. Байкалов; написание статьи – П.Г. Мадонов; редактирование статьи – А.Ж. Фурсова, А.П. Надеев, П.Г. Мадонов; разработка дизайна исследования – П.Г. Мадонов, Н.П. Леонов; статистический анализ данных, оформление статьи – В.Е. Забанова, Г.И. Байкалов).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen C.C., Manning A.M. TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells // *Cytokine*. 1996;8(1):58–65. DOI: 10.1006/cyto.1995.0008.
2. Nakamura M., Nishida T. Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells // *Cornea*. 1999;18(4):452–458. DOI: 10.1097/00003226-199907000-00011.
3. Ebihara N., Matsuda A., Nakamura S., Matsuda H., Murakami A. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2011;52(12):8549–8557. DOI: 10.1167/iov.11-7956.
4. Hafezi F., Gatziofufas Z., Angunawela R., Ittner L.M. Absence of IL-6 prevents corneal wound healing after deep excimer laser ablation in vivo // *Eye (Lond)*. 2018;32(1):156–157. DOI: 10.1038/eye.2017.238.
5. Wilson S.E. Corneal wound healing // *Exp. Eye Res*. 2020;197:108089. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108089.
6. Бубнова Н.А., Стернин Ю.И. Системная энзимотерапия в хирургической практике: учеб. пособие для врачей. СПб.: ИнформМед, 2011. 44 с.
7. Лысикова М., Вальд М., Масиновский З. Механизмы воспалительной реакции и воздействие на них с помощью протеолитических энзимов // *Цитокины и воспаление*. 2004;3(3):48–53.
8. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кикхтенко Н.В. Химические и фармакологические свойства субтилизинов // *Сиб. науч. мед. журн*. 2016;36(3):13–22.
9. Omura K., Hitosugi M., Zhu X. et al. A newly derived protein from *Bacillus subtilis natto* with both anti-thrombotic and fibrinolytic effects // *J. Pharmacol. Sci*. 2005;99(3):247–251. DOI: 10.1254/jphs.f0050408.
10. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кикхтенко Н.В. Таргетная фармакодинамика субтилизинов // *Сиб. науч. мед. журн*. 2016;36(4):15–24.
11. Дыгай А.М., Першина О.В., Крупин В.А. и др. Изучение антифибротической активности модифицированной и нативной гиалуронидазы при пневмофиброзе // *Сиб. науч. мед. журн*. 2017;37(4):5–10.
12. Ермолаева Л.А., Фомина Т.И., Дубская Т.Ю. и др. Исследование безопасности и оценка местнораздражающего действия фармакологической субстанции на основе полксамер-гиалуронат-эндо-В-Н-ацетилгексозаминидазы при ее многократном эндотрахеальном введении // *Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы II Всерос. науч. конф (Томск, 13–15 июня 2017 г.) / под ред. акад. РАН А.М. Дыгая. – Томск: Печатная мануфактура, 2017. С. 11.*
13. Скурихин Е.Г., Першина О.В., Крупин В.А. и др. Эффекты и механизм действия пегилированной гиалуронидазы у мышей C57BL/6 в условиях блеомицин-индуцированного фиброза легких // *Патогенез*. 2015;13(3):56–64.
14. Skurikhin E.G., Pershina O.V., Reztsova A.M. et al. Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by pegylated hyaluronidase and dopamine receptor

REFERENCES

1. Chen C.C., Manning A.M. TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells. *Cytokine*. 1996;8(1):58–65. DOI: 10.1006/cyto.1995.0008.
2. Nakamura M., Nishida T. Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells. *Cornea*. 1999;18(4):452–458. DOI: 10.1097/00003226-199907000-00011.
3. Ebihara N., Matsuda A., Nakamura S., Matsuda H., Murakami A. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2011;52(12):8549–8557. DOI: 10.1167/iov.11-7956.
4. Hafezi F., Gatziofufas Z., Angunawela R., Ittner L.M. Absence of IL-6 prevents corneal wound healing after deep excimer laser ablation in vivo. *Eye (Lond)*. 2018;32(1):156–157. DOI: 10.1038/eye.2017.238.
5. Wilson S.E. Corneal wound healing. *Exp. Eye Res*. 2020;197:108089. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108089.
6. Bubnova N.A., Sternin Yu.I. (2011). *Systemic Enzyme Therapy in Surgical Practice: Manual for Doctors*. Saint Petersburg. 44 p. (In Russ.)
7. Lysikova M., Wald M., Masinovsky Z. The mechanisms of the inflammatory response and the impact on them using proteolytic enzymes. *Cytokines and Inflammation*. 2004;3(3):48–53. (In Russ.)
8. Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V. Chemical and pharmacological properties of subtilisins. *The Siberian Scientific Medical Journal*. 2016;36(3):13–22. (In Russ.)
9. Omura K., Hitosugi M., Zhu X. et al. A newly derived protein from *Bacillus subtilis natto* with both anti-thrombotic and fibrinolytic effects. *J. Pharmacol. Sci*. 2005;99(3):247–251. DOI: 10.1254/jphs.f0050408.
10. Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V. Targeted pharmacodynamic of subtilisins. *The Siberian Scientific Medical Journal*. 2016;36(4):15–24. (In Russ.)
11. Dygay A.M., Pershina O.V., Krupin V.A. et al. Study of antifibrotic activity of modified and native hyaluronidase at pulmonary fibrosis. *The Siberian Scientific Medical Journal*. 2017;37(4):5–10. (In Russ.)
12. Ermolaeva L.A., Fomina T.I., Dubskaya T.Yu. et al. (2017). Safety study and assessment of the local irritation effect of a pharmacological substance based on poloxamer-hyaluronate-endo-B-N-acetylhexosaminidase with multiple endotracheal administration. In *Current Drug Toxicology: Essential and Practical Aspects*. Proceedings of the 2nd All Russian Scientific Conference (Tomsk, 13–15 June 2017) / ed. A.M. Dygay. Tomsk. P. 11. (In Russ.)
13. Skurikhin E.G., Pershina O.V., Krupin V.A. et al. Effects and mechanism of pegylated hyaluronidase in C57BL/6 mice under bleomycin induced pulmonary fibrosis. *Pathogenesis*. 2015;13(3):56–64. (In Russ.)
14. Skurikhin E.G., Pershina O.V., Reztsova A.M. et al. Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by pegylated hyaluronidase and dopamine receptor antagonist in mice. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125065. DOI: 10.1371/journal.pone.0125065.

- antagonist in mice // PLoS One. 2015;10(4):e0125065. DOI: 10.1371/journal.pone.0125065.
15. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. Specific activity of electron-beam synthesis immobilized hyaluronidase on G-CSF induced mobilization of bone marrow progenitor cells // Stem Cell Rev. Rep. 2013;9(2):140-147. DOI: 10.1007/s12015-012-9423-2.
 16. Mccann M. Intravenous hyaluronidase for visual loss secondary to filler injection: a novel therapeutic approach // J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2019;12(12):25-27.
 17. Pereira P.A.T., Bitencourt C.S., Reis M.B. et al. Immunomodulatory activity of hyaluronidase is associated with metabolic adaptations during acute inflammation // Inflamm. Res. 2020;69(1):105-113. DOI: 10.1007/s00011-019-01297-x.
 18. Kalandar A., Williams J., Lalonde D. Can we restore vision? A cadaveric study using hyaluronidase for retinal artery occlusion // Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open. 2019;7(9):e2412. DOI: 10.1097/GOX.0000000000002412.
 19. Washington P.M., Lee C., Dwyer M.K.R. et al. Hyaluronidase reduced edema after experimental traumatic brain injury // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2019;40(10):271678X19882780. DOI: 10.1177/0271678X19882780.
 20. Дыгай А.М., Артамонов А.В., Бекарев А.А. и др. Нанотехнологии в фармакологии. М.: Изд-во РАМН, 2011. 136 с.
 21. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В. и др. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Медицина и образование в Сибири. 2013;4:83.
 22. Obenberger J. Paper strips and rings as simple tools for standartization of experimental eye injuries // Ophthalmol. Res. 1975;7:363-366.
 15. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. Specific activity of electron-beam synthesis immobilized hyaluronidase on G-CSF induced mobilization of bone marrow progenitor cells. *Stem Cell Rev. Rep.* 2013;9(2):140-147. DOI: 10.1007/s12015-012-9423-2.
 16. Mccann M. Intravenous hyaluronidase for visual loss secondary to filler injection: a novel therapeutic approach. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2019;12(12):25-27.
 17. Pereira P.A.T., Bitencourt C.S., Reis M.B. et al. Immunomodulatory activity of hyaluronidase is associated with metabolic adaptations during acute inflammation. *Inflamm. Res.* 2020;69(1):105-113. DOI: 10.1007/s00011-019-01297-x.
 18. Kalandar A., Williams J., Lalonde D. Can we restore vision? A cadaveric study using hyaluronidase for retinal artery occlusion. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* 2019;7(9):e2412. DOI: 10.1097/GOX.0000000000002412.
 19. Washington P.M., Lee C., Dwyer M.K.R. et al. Hyaluronidase reduced edema after experimental traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2019;40(10):271678X19882780. DOI: 10.1177/0271678X19882780.
 20. Dygai A.M., Artamonov A.V., Bekarev A.A. et al. (2011). *Nanotechnologies in Pharmacology*. Moscow. 136 p. (In Russ.)
 21. Madonov P.G., Ershov K.I., Dubrovin A.V. et al. Electron-beam modification of preparations of the albuminous nature for improvement of their pharmacological properties. *Medicine and Education in Siberia.* 2013;4:83. (In Russ.)
 22. Obenberger J. Paper strips and rings as simple tools for standartization of experimental eye injuries. *Ophthalmol. Res.* 1975;7:363-366.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Забанова Виктория Евгеньевна – ассистент кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии Института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-9879-8986.

Ершов Константин Игоревич – канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий Института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-41399-036x.

Селякова Мария Сергеевна – канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государ-

ABOUT THE AUTHORS

Viktoriya E. Zabanova – Assistant, Department of Ophthalmology, Novosibirsk State Medical University; Junior Researcher, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-9879-8986.

Konstantin I. Ershov – Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Researcher, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4139-036X.

Maria S. Selyakova – Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-9521-2641.

Nikolai P. Leonov – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4364-8937.

ственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-9521-2641.

Леонов Николай Петрович – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий Института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4364-8937.

Байкалов Герман Игоревич – клинический ординатор ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул Института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-5445-9920.

Фурсова Анжела Жановна – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-6311-5452.

Надеев Александр Петрович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

Мадонов Павел Геннадьевич – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель отдела экспериментальной фармакологии Института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

German I. Baykalov – Resident, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5445-9920.

Anzhella Zh. Fursova – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Ophthalmology, Novosibirsk State Medical University; Leading Researcher, Institute Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-6311-5452.

Aleksander P. Nadeev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

Pavel G. Madonov – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Head, Department of Experimental Pharmacology, Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1093-8938.