

Экспериментальное изучение аллергизирующего действия препарата на основе гиалуронидазы, пегилированной по технологии электронно-лучевого синтеза

В.Е. Забанова^{1, 2}, К.И. Ершов^{1, 2}, А.М. Швецова², Е.Ю. Шерстобоев³, В.В. Жданов³, Т.А. Дробышева¹, А.Ж. Фурсова^{1, 2}, П.Г. Мадонов^{1, 2}

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

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

³Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Гиалуронидаза – ферментный препарат, широко использующийся в медицине, в том числе и офтальмологии. Гиалуронидаза, имея белковую структуру, несет потенциальную опасность в виде нежелательных аллергических реакций. Чтобы избежать аллергизирующих эффектов, белковые структуры модифицируют путем соединения с полимерным носителем, например полиэтиленгликолем.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я . Изучение возможного аллергогенного действия гиалуронидазы, пегилированной по технологии электронно-лучевого синтеза, при различных путях введения.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Объект исследования – пегилированная гиалуронидаза (ПЭГ-Гиал). Экспериментальные животные – мыши-гибриды и морские свинки. Было проведено 7 типов экспериментов: анафилактическая активность; конъюнктивальная проба; кожные аппликации; реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ); активная кожная анафилаксия; непрямая реакция дегрануляции тучных клеток; реакция воспаления на конканавалин А (КонА).

Р е з у л ь т а т ы . При изучении анафилактической активности анафилактической реакции у морских свинок не наблюдалось. Конъюнктивальный тест также не выявил признаков повышенной чувствительности к препарату. При исследовании сенсибилизирующего действия не наблюдалось развития местных аллергических реакций. В экспериментах по изучению реакции ГЗТ на мышях не выявлено достоверных различий индекса реакции ГЗТ в опытной и контрольной группах. В эксперименте по оценке активной кожной анафилаксии показано, что диаметр окрашенного пятна достоверно не отличался в обеих опытных группах от контрольной. В экспериментах по непрямо́й реакции дегрануляции тучных клеток установлено, что статистически значимого изменения показателя дегрануляции тучных клеток не наблюдалось. Оценка аллергизирующего действия ПЭГ-Гиал в реакции воспаления на КонА показала, что нет статистически достоверной разницы между опытными и контрольными группами.

З а к л ю ч е н и е . На основании результатов проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что ПЭГ-Гиал не обладает аллергизирующим действием при различных путях введения, что существенно расширяет возможности ее клинического применения.

Ключевые слова: гиалуронидаза, пегилированная гиалуронидаза, аллергизирующее действие, сенсибилизация, реакция гиперчувствительности замедленного типа.

Образец цитирования: Забанова В.Е., Ершов К.И., Швецова А.М., Шерстобоев Е.Ю., Жданов В.В., Фурсова А.Ж., Мадонов П.Г. Экспериментальное изучение аллергизирующего действия препарата на основе гиалуронидазы, пегилированной по технологии электронно-лучевого синтеза // Journal of Siberian Medical Sciences. 2023;7(2):114-127. DOI: 10.31549/2542-1174-2023-7-2-114-127

Поступила в редакцию 18.04.2023
Прошла рецензирование 03.05.2023
Принята к публикации 17.05.2023

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 18.04.2023
Revised 03.05.2023
Accepted 17.05.2023

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

Experimental study of the allergenic potential of a drug based on hyaluronidase PEGylated using the technology of electron beam synthesis

V.E. Zabanova^{1,2}, K.I. Ershov^{1,2}, A.M. Shvetsova², E.Yu. Sherstoboev³, V.V. Zhdanov³,
T.A. Drobysheva¹, A.Zh. Fursova^{1,2}, 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 of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Hyaluronidase is an enzyme preparation widely used in medicine, including ophthalmology. Hyaluronidase, having a protein structure, carries a potential danger in the form of undesirable allergic reactions. To avoid allergenic effects, protein structures are modified by combining with a polymer carrier, for example, by polyethylene glycol (PEG).

A i m . To study the possible allergenic potential of hyaluronidase, PEGylated using the technology of electron beam synthesis, with various routes of administration.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The object of the study is PEGylated hyaluronidase (PEG-Hyal). Experimental animals are hybrid mice and guinea pigs. Seven types of experiments were carried out: anaphylactogenic activity; conjunctival challenge test; cutaneous applications; delayed-type hypersensitivity (DTH); active cutaneous anaphylaxis; indirect mast cell degranulation; inflammatory response to concanavalin A (ConA).

R e s u l t s . When studying anaphylactogenic activity, an anaphylactic reaction was not observed in guinea pigs. The conjunctival challenge test also revealed no signs of hypersensitivity to the drug. In the study of sensitization, no development of local allergic reactions was observed. In experiments to the study DTH in mice, there were no significant differences for the DTH index in the experimental and control groups. The assessment of active skin anaphylaxis has been showed that the diameter of the stained spot did not significantly differ in both experimental groups from the control one. In indirect mast cell degranulation experiments, it was found that there was no statistically significant change in the mast cell degranulation index. Evaluation of the allergenic potential of PEG-Hyal in the inflammatory response to ConA showed that there is no statistically significant difference between the experimental and control groups.

C o n c l u s i o n . Based on the results of the experiments, it can be concluded that PEG-Hyal does not have an allergenic potential in various routes of administration, which significantly expands the possibilities of its clinical use.

Keywords: hyaluronidase, PEGylated hyaluronidase, allergenic potential, sensitization, delayed-type hypersensitivity.

Citation example: Zabanova V.E., Ershov K.I., Shvetsova A.M., Sherstoboev E.Yu., Zhdanov V.V., Fursova A.Zh., Madonov P.G. Experimental study of the allergenic potential of a drug based on hyaluronidase PEGylated using the technology of electron beam synthesis. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2023;7(2):114-127. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-7-2-114-127

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуронидаза широко используется в различных областях медицины, включая анестезиологию, кардиологию, рентгенографию, онкологию, офтальмологию, пластическую хирургию, эстетическую медицину. Она имеет широкий спектр клинических применений благодаря своей уникальной способности облегчать рассеивание и/или всасывание различных лекарственных препаратов. Этот фермент также используется для лечения келоидных рубцов в качестве альтернативы стероидам, для лечения гематом и

INTRODUCTION

Hyaluronidase is used in various fields of medicine, including anesthesiology, cardiology, radiography, oncology, ophthalmology, plastic surgery, aesthetic medicine. It has a wide range of clinical applications because of its unique ability to facilitate the dispersion and/or absorption of various drugs. This enzyme is also used to treat keloid scars as an alternative to steroids, to treat hematomas and lymphedema. Hyaluronidase can also be used to eliminate persistent edema, given its ability to increase the permeability of capillaries and tissues.

лимфедемы. Также можно использовать гиалуронидазу для устранения стойких отеков, учитывая ее способность увеличивать проницаемость капилляров и тканей.

Однако, имея белковую структуру, этот нативный фермент несет потенциальную опасность для организма в виде высокой иммуногенности и аллергического потенциала. При использовании гиалуронидазы в основном возникают местные аллергические реакции. Сообщается, что частота аллергических реакций составляет от 0.05 до 0.69 % [1, 2]. Аллергические реакции на гиалуронидазу представляют собой реакции гиперчувствительности немедленного действия (тип I, опосредованный иммуноглобулином E), встречаются менее чем в 0.1 % случаев, также могут возникать реакции гиперчувствительности замедленного типа (тип IV, опосредованный Т-клетками) [3, 4]. В 2016 г. было опубликовано сообщение о реакции гиперчувствительности немедленного типа при использовании гиалуронидазы в сочетании с местными анальгетиками при оперативных вмешательствах на глазах, когда в раннем послеоперационном периоде наблюдался отек век и хемоз конъюнктивы, который был купирован использованием антигистаминных препаратов и глюкокортикостероидов [5]. Реакция замедленного типа в ответ на введение гиалуронидазы отмечалась в виде целлюлита орбитальной клетчатки с последующей необратимой потерей зрения [6, 7].

Предполагается существование связи между способом введения и дозировкой, что может быть фактором тяжести аллергической реакции. В целом при местном введении гиалуронидазы в дозах менее 1500 МЕ наблюдаются локальные аллергические реакции (например, отек, эритема, крапивница) в области инъекции без общих симптомов [8]. Когда дозы варьируют от 1500 до 200 000 МЕ и/или вводятся внутривенно, у большинства пациентов с аллергией наблюдаются более общие симптомы [8, 9].

Тестирование на кожную аллергию широко распространено в практике эстетической медицины для предотвращения анафилактической реакции, однако наиболее ценной информацией для врача является история болезни пациента – прием лекарств, аллергии и любая реакция на предшествующее воздействие гиалуронидазы. Существуют определенные группы пациентов, у которых при возникновении реакции I типа на какой-либо препарат или аллерген будет более выраженный анафилактический ответ. Примерами таких пациентов являются люди, принима-

However, having a protein structure, this native enzyme carries a potential danger to the body as high immunogenicity and allergenic potential. When using hyaluronidase, local allergic reactions occur. It is reported that the frequency of allergic reactions ranges from 0.05 to 0.69% [1, 2]. Allergic reactions to hyaluronidase are immediate hypersensitivity reactions (type I, mediated by immunoglobulin E), occur in less than 0.1% of cases, delayed-type hypersensitivity reactions may also occur (type IV, mediated by T cells) [3, 4]. In 2016, a report was published on an immediate hypersensitivity reaction to hyaluronidase in combination with local anesthetics during eye phacoemulsification, when in the early postoperative period there were lid edema and conjunctival chemosis, which were managed with antihistamines and glucocorticosteroids [5]. Delayed hypersensitivity reaction in response to introducing hyaluronidase was noted in the form of orbital cellulitis with subsequent irreversible loss of vision [6, 7].

It is assumed that there is a relationship between the route of administration and dose strength, which may be a factor in the severity of allergic reaction. In general, with topical administration of hyaluronidase at doses less than 1500 IU, local allergic reactions (for example, edema, erythema, urticaria) are observed in the injection site without general symptoms [8]. When doses range from 1500 to 200 000 IU and/or are administered intravenously, most patients with allergy experience more general symptoms [8, 9].

Skin testing is widespread in the practice of aesthetic medicine to prevent anaphylactic reaction, but the most valuable information for a doctor is the patient's medical history – taking medications, allergies and any response to hyaluronidase. There are certain groups of patients who, when a type I reaction to a drug or allergen occurs, will have a more pronounced anaphylactic response. Examples of such patients are people taking angiotensin converting enzyme inhibitors, beta-blockers, patients with mast cell activation and high trypsin levels, susceptibility to allergic reactions, with C1-esterase deficiency, hereditary angioedema [10].

To increase the effectiveness, reduce the sensitization and toxicity of protein-based drugs, their modification is used – physico-chemical transformation via the conjugation of a protein molecule with a polymer carrier. At the moment, a lot of attention is paid to polyethylene glycols (PEG) of various molecular weights. Conjugation of a poly-

ющие ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, бета-блокаторы, пациенты с поражением тучных клеток и высоким уровнем трипсина, предрасположенностью к аллергическим реакциям, с дефицитом С1-эстеразы, наследственным ангионевротическим отеком [10].

Для повышения эффективности, снижения аллергенности и токсичности лекарственных препаратов белковой природы используется их модификация – физико-химическая трансформация за счет соединения белковой молекулы с полимерным носителем. На данный момент много внимания уделяется полиэтиленгликолям (ПЭГ) различной молекулярной массы. Процесс присоединения молекулы полиэтиленгликоля к другой молекуле носит название пегилиция или пегилирование. Эффекты пегилированных препаратов модифицируются за счет повышения растворимости в воде; устойчивости к действию ферментов, полностью их разрушающих или частично снижающих концентрацию в тканях препарата; адресной доставки лекарственного препарата до мишени. Помимо этого, пегилирование продлевает период его полувыведения и способно снижать иммуногенность [11].

В нашем исследовании мы изучали аллергизирующие свойства пегилированной гиалуронидазы с целью расширения потенциальных направлений применения данного препарата, в том числе и в офтальмологии. Данное исследование выполнено в трех учреждениях, указанных в аффилиации. Публикация данной статьи одобрена Локальным экспертным комитетом Института клинической и экспериментальной лимфологии (Новосибирск) (протокол № 179 от 23.03.2023).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение возможного аллергического действия гиалуронидазы, пегилированной по технологии электронно-лучевого синтеза, при различных путях введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Пегилированная гиалуронидаза (ПЭГ-Гиал) изготовлена в АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск) и любезно предоставлена для экспериментальных исследований в рамках научного сотрудничества. ПЭГ-Гиал представляет собой тестикулярную гиалуронидазу H20, которая была подвергнута электронно-лучевой иммобилизации на полиэтиленоксиде (Макрогол-1500) в потоке ускоренных электронов в дозе

ethylene glycol molecule with another molecule is called PEGylation. The effects of PEGylated drugs are modified by increasing solubility in water; resistance to enzymes that completely destroy them or partially reduce the tissue concentration of the drug; by targeted delivery of the drug. In addition, PEGylation prolongs its half-life and can reduce immunogenicity [11].

In our study, we investigated the allergenic properties of PEGylated hyaluronidase in order to expand the potential uses of this drug, including ophthalmology. This study was carried out in three institutions specified in the affiliation. The publication of this article was approved by the Local Expert Committee of the Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk) (No. 179 dated 2023-03-23).

AIM OF THE RESEARCH

To study the possible allergenic potential of hyaluronidase PEGylated using the technology of electron beam synthesis with various routes of administration.

MATERIALS AND METHODS

Object of study. Pegylated hyaluronidase (PEG-Hyal) was manufactured by Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology, JSC (Novosibirsk) and kindly provided for experimental research within the scientific cooperation. PEG-Hyal is a testicular hyaluronidase H20, which was subjected to electron beam immobilization on polyethylene oxide (Macro-gol-1500) in accelerated electron flux 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-Hyal used in the experiments is a lyophilized powder of light gray color with an enzymatic activity of 2800 IU per 1 g of dry matter, easily soluble in crystalloid and colloidal solutions.

Currently, there are no approved PEG-Hyal-based medications to treat degenerative diseases. Meanwhile, there is a long-term research experience in determining the specific regenerative activity of PEG-Hyal [12–16]. This circumstance provides for the positioning of this drug as a medication for regenerative medicine not for bolus injection, but for long-term use. Where, the most compliant is topical and oral administration of PEG-Hyal medications.

Experimental animals. F1(CBA/C57Bl/6), Balb/c hybrid mice of both sexes aged 6–8 weeks weighing 18–20 g. Guinea pigs of both sexes weigh-

1.5 Мрад, создаваемым импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (производство – Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск). Используемая в экспериментах ПЭГ-Гиал представляет собой лиофилизированный порошок светло-серого цвета с ферментативной активностью 2800 ЕД в 1 г сухого вещества, легко растворяющийся в кристаллоидных и коллоидных растворах.

В настоящее время нет зарегистрированных лекарственных препаратов на основе ПЭГ-Гиал для лечения дегенеративных заболеваний. Между тем есть многолетний опыт исследований по определению специфической регенеративной активности ПЭГ-Гиал [12–16]. Это обстоятельство предполагает позиционирование данного препарата как средства для регенеративной медицины, предусматривающего не болюсное, а курсовое длительное применение. В этом случае максимально комплаентным является местный и пероральный прием лекарственных препаратов на основе ПЭГ-Гиал.

Экспериментальные животные. Мыши-гибриды обоего пола F1(CBA/C57Bl/6), Balb/c 6–8-недельного возраста массой тела 18–20 г. Морские свинки обоего пола массой 250–270 г. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» от 01.07.2016; ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» от 01.07.2016. 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).

Методы изучения алергизирующего действия. Изучение алергизирующего действия ПЭГ-Гиал проводилось согласно [17] и состояло из 7 экспериментов:

1. Изучение анафилактической активности на морских свинках самцах (♂) и самках (♀). Сенсибилизацию животных осуществляли внутрижелудочным введением ПЭГ-Гиал в течение 5 суток в дозах 20.83 ЕД/кг (1 терапевтическая доза (ТД)) и 208.3 ЕД/кг (10 ТД). Анафилактические свойства ПЭГ-Гиал выявляли путем внутривенного введения раствора препарата на 14-е сутки после

ing 250–270 g. The animals were kept in accordance with the rules adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986); GOST 33216-2014 Guidelines for the Management and Care of Laboratory Animals. Rules for the Management and Care of Laboratory Rodents and Rabbits dated 2016-07-01; GOST 33215-2014 Guidelines for Accommodation and Care of Animals. Environment, Housing and Management dated 2016-07-01. The animals were removed from the experiment after 24 hours in accordance with modern methods of euthanasia of laboratory animals (according to EU-Directive 2010/63/ on the use of animals for scientific purposes, the European Parliament and the Council of the European Union).

Methods of studying the allergenic potential. The study of the allergenic potential of PEG-Hyal was carried out according to [17] and consisted of 7 experiments:

1. Study of anaphylactogenic activity on male (♂) and female (♀) guinea pigs.

Animals were sensitized by intragastric administration of PEG-Hyal for 5 days at doses of 20.83 IU/kg (1 curative dose (CD)) and 208.3 U/kg (10 CD). The anaphylactogenic properties of PEG-Hyal were detected by intravenous administration of the drug solution on the 14th day following the last sensitizing application. Challenge test with intravenous administration of the studied drug was carried out at a dose of 208.3 IU/kg, which was ten-fold curative dose for guinea pigs. This dose was used both in guinea pigs with the administration of 1 CD and 10 CD. The control was non-sensitized guinea pigs, to which the drug was administered intravenously. The intensity of the anaphylactic reaction was evaluated by the Weigle method [18] using the formula

$$AI = (4 \cdot n + 3 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + 1 \cdot n_3) / N,$$

AI – anaphylactic index;

n – number of animals whose anaphylactic reaction resulted in death;

n_1 – number of animals with intense manifestations of anaphylactic reaction;

n_2 – number of animals with moderate anaphylactic reaction;

n_3 – number of animals with mild anaphylactic reaction;

N – total number of animals in the group.

With an AI value of ≤ 1.0 , the anaphylactic reaction was considered negative.

последнего сенсibilизирующего применения. Разрешающее тестирующее внутривенное введение исследуемого препарата проводилось в дозе 208.3 ЕД/кг, которая составляла десятикратную терапевтическую дозу для свинок. Эта доза применялась как у морских свинок с введением 1 ТД, так и 10 ТД. Контролем служили несенсибилизированные морские свинки, которым препарат вводили внутривенно. Интенсивность анафилактической реакции оценивали по методу W.O. Weigle [18] с использованием формулы

$$AI = (4 \cdot n + 3 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + 1 \cdot n_3) / N,$$

где AI – анафилактический индекс;

n – число животных, анафилактическая реакция которых заканчивалась смертельным исходом;

n_1 – число животных со значительными проявлениями анафилактической реакции;

n_2 – число животных со средними проявлениями реакции;

n_3 – число животных со слабыми проявлениями реакции;

N – общее число животных в группе.

При величине $AI \leq 1.0$ анафилактическая реакция считалась отрицательной.

2. Конъюнктивальная проба на морских свинках. Через 24 ч после завершения 5-дневного цикла сенсibilизирующих введений ПЭГ-Гиал внутривенно в дозах 20.83 ЕД/кг и 208.3 ЕД/кг проводилось конъюнктивальное тестирование. Тест заключался в закапывании в левый глаз каждого животного 20 мкл раствора ПЭГ-Гиал с концентрацией 167 ЕД/мл (доза, не вызывающая раздражающего действия у интактных животных), в правый глаз – 2% раствор ПЭГ в том же объеме. Оценка состояния конъюнктивы глаза проводилась через 15 мин, 24 и 48 ч по следующей шкале (в баллах): 1 – легкое покраснение слезного протока; 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице; 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

3. Метод накожных аппликаций на морских свинках. Исследование сенсibilизирующего действия ПЭГ-Гиал проводили путем 20 повторных накожных аппликаций на участок боковой поверхности туловища размером 2×2 см по 5 раз в неделю. Наносили по 3 капли раствора ПЭГ-Гиал с концентрацией 167 ЕД/мл (доза, не вызывающая местнораздражающего действия). Контрольным группам морских свинок (5 самцов и 5 самок) наносили растворитель – 2% раствор ПЭГ-1500. Первое тестирование проводили после 10 аппликаций, второе – после 20. Реакцию кожи

2. Conjunctival challenge test on guinea pigs. Twenty-four hours after the completion of the 5-day cycle of sensitizing injections of PEG-Hyal intragastrically at doses of 20.83 IU/kg and 208.3 IU/kg, conjunctival testing was performed. The test consisted in instilling of 20 ml of PEG-Hyal solution at a concentration of 167 IU/ml (a dose that does not cause irritating effects in intact animals) into the left eye of each animal, and 2% PEG solution in the same volume – into the right eye. The assessment of the conjunctiva was carried out after 15 min, 24 and 48 hours using the following scale (in points): 1 – mild redness of the lacrimal duct; 2 – redness of the lacrimal duct and sclera in the direction of the cornea; 3 – redness of the entire conjunctiva and sclera.

3. Cutaneous applications on guinea pigs. The study of the sensitizing effect of PEG-Hyal was carried out by 20 repeated cutaneous applications to a 2×2 cm area of the lateral surface of the trunk 5 times a week. Three drops of PEG-Hyal solution were applied at a concentration of 167 IU/ml (a dose that does not cause local irritant effect). Control groups of guinea pigs (5 males and 5 females) were applied a solvent – a 2% PEG-1500 solution. The first test was performed after 10 applications, the second – after 20. The skin reaction was assessed according to the following criteria: if the skin in the area of drug application remains unchanged, the reaction is negative (–); if erythema appears at the site of application, the mild positive reaction (+) is registered; the presence of erythema and edema is evaluated as the positive reaction (++); when erythema and edema go beyond the limits of the drug's contact with the skin, the reaction is assessed as the strong positive (+++); when hyperergia is characterized by an extensive peripheral edema, erythema, vesiculation and ulceration of the skin, then the reaction is of the highest degree (++++).

4. Delayed-type hypersensitivity (DTH) in mice. Outbred albino mice were sensitized with a single intradermal injection of 60 µl of an emulsion consisting of 30 µl of PEG-Hyal solution at a concentration of 167 IU/ml and 30 µl of complete Freund's adjuvant (CFA) into the base of a tail. To detect sensitization 5 days later, 40 µl PEG-Hyal solution at a concentration of 167 IU/ml was injected into the pad of the hind paw of mice. Following six and twenty-four hours after the sensitizing injection, the intensity of DTH was evaluated by the reaction index (RI), which was calculated individually for each animal according to the formula

учитывали по следующим критериям: если кожа в области нанесения препарата остается неизменной – реакция отрицательная (–); при слабоположительной реакции (+) на месте нанесения появляется эритема; наличие эритемы и отека кожи оценивается как положительная реакция (++) при резкоположительной реакции (++++) эритема и отек выходят за пределы контакта препарата с кожей; высшая степень реакции (+++++) – гиперергия – выражается в обширном периферическом отеке, эритеме, везикуляции и изъязвлении кожи.

4. Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах. Беспородных мышей-альбиносов сенсибилизировали однократным внутрикожным введением в основание хвоста 60 мкл эмульсии, состоящей из 30 мкл раствора ПЭГ-Гиал с концентрацией 167 ЕД/мл и 30 мкл полного адъюванта Фрейнда (ПАФ). Для выявления сенсибилизации через 5 сут мышам в подушечку задней лапы вводили 40 мкл раствора ПЭГ-Гиал с концентрацией 167 ЕД/мл. Через 6 и 24 ч после сенсибилизирующей инъекции интенсивность реакции ГЗТ оценивали по индексу реакции (ИР), который вычисляли индивидуально для каждого животного по формуле

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

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

Контрольных животных сенсибилизировали эмульсией ПАФ с раствором Хенкса по той же схеме, что и в опыте.

5. Активная кожная анафилаксия на мышах. Мышей линии Balb/c сенсибилизировали путем введения ПЭГ-Гиал в течение 5 суток внутрижелудочно в дозе 50 ЕД/кг (1 ТД) в 0.2 мл 2% раствора ПЭГ-1500 (1-я группа) и в дозе 500 мкг/кг (10 ТД) в 0.2 мл 2% раствора ПЭГ-1500 (2-я группа). Разрешающее введение ПЭГ-Гиал осуществляли через 1 неделю после последнего сенсибилизирующего применения в двукратных разведениях препарата в дозах 0.5 ЕД и 1 ЕД внутрикожно в объеме 0.03 мл. Через 20 мин мышам внутривенно вводили 0.5 мл 1% раствора синего Эванса. Через 30 мин проводили эвтаназию животных и определяли размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в месте введения препарата. Разрешающие инъекции ПЭГ-Гиал и синего Эванса вводили также контрольным животным, которым в дни сенсибилизации опытных групп вводили только растворитель – 2% раствор ПЭГ.

$$\text{RI (\%)} = (M_{\text{exp}} - M_{\text{c}}) / M_{\text{c}} \cdot 100 \%,$$

M_{exp} – weight of the paw of the experimental animal;

M_{c} – weight of the paw of the control animal.

Control animals were sensitized using CFA emulsion with Hanks' solution according to the same scheme as in the experiment.

5. Active cutaneous anaphylaxis in mice. Balb/c mice were sensitized by administration of PEG-Hyal for 5 days intragastrically at a dose of 50 IU/kg (1 CD) in 0.2 ml of a 2% solution of PEG-1500 (group 1), and at a dose of 500 µg/kg (10 CD) in 0.2 ml of a 2% solution of PEG-1500 (group 2). The challenge injection of PEG-Hyal was performed 1 week after the last sensitizing procedure in twofold dilutions of the drug at doses of 0.5 IU and 1 IU intradermally in a volume of 0.03 ml. Twenty minutes after, 0.5 ml of a 1% Evans blue solution was intravenously administered to mice. Thirty minutes later, the animals were euthanized and the size of the blue spot on the inside of the skin at the injection site was determined. The challenge injections of PEG-Hyal and Evans blue were also administered to control animals, which were injected with a solvent only – 2% PEG solution on the days of sensitization of the experimental groups.

6. Indirect mast cell degranulation in mice. At the end of the 5-day administration of PEG-Hyal to CBA/C57Bl/6 mice at doses of 50 IU/kg and 500 IU/kg, the animals were euthanized and blood serum was obtained, which was then tested for the ability to cause mast cell degranulation in the presence of a specific PEG-Hyal antigen. To obtain mast cells, intact CBA/C57Bl/6 mice were euthanized, 4–5 ml of Hanks solution without phenol red was injected intraperitoneally, after a light massage of the abdominal wall for 1–1.5 min, an incision was made with scissors along the midline and the exudate was collected into a silicone tube. The specimens were prepared on cleared slides stained with 0.3% alcohol solution of neutral red and dried at room temperature. On one side of the slide, 0.03 ml of mast cell suspension, 0.03 ml of experimental animal serum and 0.03 ml of PEG-Hyal solution at a concentration of 0.15 IU/ml were mixed (the dose of the drug was selected in advance so that the index of mast cell degranulation during incubation with the test substance did not exceed 5%), this area was experimental; on the other side of the slide, 0.03 ml of mast cell suspension, 0.03 ml of experimental animal serum and 0.03 ml of Hanks' solution were

6. Непрямая реакция дегрануляции тучных клеток на мышах. По окончании 5-дневного курса введения мышам линии СВА/С57В1/6 ПЭГ-Гиал в дозах 50 ЕД/кг и 500 ЕД/кг проводили эвтаназию животных и получали сыворотку крови, которую затем тестировали на способность вызывать дегрануляцию тучных клеток в присутствии специфического антигена ПЭГ-Гиал. Для получения тучных клеток проводили эвтаназию интактных мышей линии СВА/С57В1/6, вводили внутрибрюшинно 4–5 мл раствора Хенкса без фенолового красного, после легкого массажа брюшной стенки в течение 1–1.5 мин делали ножницами разрез по средней линии и собирали экссудат в силиконизированную пробирку. Препараты готовили на обезжиренных предметных стеклах, окрашенных 0.3% спиртовым раствором нейтрального красного и высушенных при комнатной температуре. С одной стороны предметного стекла смешивали 0.03 мл взвеси тучных клеток, 0.03 мл сыворотки подопытного животного и 0.03 мл раствора ПЭГ-Гиал с концентрацией 0.15 ЕД/мл (дозу препарата подбирали заранее, так чтобы показатель дегрануляции тучных клеток при инкубации с исследуемым веществом не превышал 5 %) – опыт; с другой стороны – 0.03 мл взвеси тучных клеток, 0.03 мл сыворотки подопытного животного и 0.03 мл раствора Хенкса – контроль. Далее препараты покрывали покровными стеклами, затем инкубировали 15 мин в термостате при 37° С. Препараты изучали при увеличении $\times 20$. Оценку результатов проводили дифференциальным способом, подсчитывали показатель дегрануляции тучных клеток (ПДТК) по формуле

$$\text{ПДТК} = (1a + 2b + 3c + 3d) / 100,$$

где a, b, c, d – количество дегранулированных клеток соответственно степени дегрануляции (слабо выраженной, умеренной, резкой и полной дегрануляции клеток).

7. Оценка алергизирующего действия в реакции воспаления на конканавалин А (КонА). Опыты проводили на беспородных белых мышах массой 18–20 г. ПЭГ-Гиал вводили животным перорально в двух дозах – 50 ЕД/кг (1 ТД) и 500 ЕД/кг (10 ТД) однократно. Мышам контрольной группы аналогичным образом вводили 2% раствор ПЭГ-1500. Через 3 ч после введения препарата или растворителя мышам опытных и контрольной групп субплантарно вводили КонА в дозе 100 мкг/20 г массы тела (20 мкл раствора в концентрации 5 мг/мл), в контрлатеральную конечность – тот же объем физиологического раствора. Через 1 ч проводили эвтаназию, опре-

mixed, and this part was control. Next, the specimens were covered with cover slips, and then incubated for 15 minutes in a thermostat at 37°C. The specimens were studied at magnification $\times 20$. The results were evaluated in a differential way, the mast cell degranulation index (MCDI) was calculated according to the formula

$$\text{MCDI} = (1a + 2b + 3c + 3d) / 100,$$

a, b, c, d – number of degranulated cells corresponds to the degree of degranulation (mild, moderate, strong and complete degranulation of cells).

7. Inflammatory response to concanavalin A (ConA). Experiments were carried out on outbred albino mice weighing 18–20 g. PEG-Hyal was administered orally to animals in two doses – 50 IU/kg (1 CD) and 500 IU/kg (10 CD) once. The control mice were similarly administered the 2% PEG-1500 solution. Three hours after the administration of the drug or solvent, the mice of the experimental and control groups were injected subplantarily with ConA at a dose of 100 $\mu\text{g}/20$ g of body weight (20 μl of solution at a concentration of 5 mg/ml), the same volume of saline solution was injected into the contralateral limb. One hour later, euthanasia was performed, the weight of the hind paws was determined and the inflammatory response index (IRI) was calculated according to the formula

$$\text{IRI} = (M_{\text{exp}} - M_c) / M_c \cdot 100 \%,$$

M_{exp} – mass of the hind paw foot, into the pad of which the ConA was injected;

M_c – mass of the hind paw foot, into the pad of which the saline solution was injected.

RESULTS AND DISCUSSION

In experiments to study the anaphylactogenic activity, it was shown that the intravenous administration of PEG-Hyal did not lead to the development of an anaphylactic reaction in guinea pigs (Table 1). The anaphylactic index in both control and experimental groups of animals was less than 1.0.

The conjunctival challenge test revealed no signs of redness of the conjunctiva or lacrimal duct in guinea pigs, which indicates the absence of hypersensitivity to the PEG-Hyal drug (Table 2).

When assessing the sensitizing effect of PEG-Hyal, no development of redness or skin edema at the site of application of the studied drug following both 10 and 20 applications was found. The

Таблица 1. Оценка влияния ПЭГ-Гиал на реакцию общей анафилаксии
Table 1. Evaluation of the effect of PEG-Hyal on the anaphylactic reaction

Группа Group	Анафилактический индекс Anaphylactic index ($\bar{X} \pm m$)
Контроль 1 (2% раствор ПЭГ) / Control 1 (2% PEG solution) ♂ ($n = 5$)	0.60 ± 0.24
ПЭГ-Гиал, доза 20.83 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 20.83 IU/kg ♂ ($n = 5$)	0.80 ± 0.20
ПЭГ-Гиал, доза 208.3 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 208.3 IU/kg ♂ ($n = 5$)	0.80 ± 0.20
Контроль 2 (2% раствор ПЭГ) / Control 2 (2% PEG solution) ♀ ($n = 5$)	0.60 ± 0.24
ПЭГ-Гиал, доза 20.83 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 20.83 IU/kg ♀ ($n = 5$)	0.60 ± 0.24
ПЭГ-Гиал, доза 208.3 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 208.3 IU/kg ♀ ($n = 5$)	0.80 ± 0.20

деляли массу лап и подсчитывали индекс реакции воспаления (ИР) по формуле

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

где $M_{\text{оп}}$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили Кона;

$M_{\text{к}}$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили физиологический раствор.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах по изучению анафилактогенной активности показано, что тестирующее внутривенное введение ПЭГ-Гиал не приводило к развитию анафилактической реакции у морских свинок (табл. 1). Анафилактический индекс как в контрольной, так и в опытных группах животных был менее 1.0.

Конъюнктивальный тест не выявил признаков покраснения конъюнктивы или слёзного протока глаз морских свинок, что свидетельствует об отсутствии повышенной чувствительности к препарату ПЭГ-Гиал (табл. 2).

При оценке сенсибилизирующего действия ПЭГ-Гиал не наблюдалось развития покраснения или отека кожи на месте нанесения исследуемого препарата как после 10, так и после 20 апплика-

skin reaction in the experimental group did not differ from the reaction in the control group (Table 3).

In the experiments studying the delayed hypersensitivity reaction in mice, we have found no significant differences in the reaction index in the experimental group of mice which received PEG-Hyal with Freund's adjuvant, compared with the control group which received Freund's adjuvant alone, following 6 and 24 hours after administration (Table 4).

When studying active cutaneous anaphylaxis, it was shown that after an intradermal challenge PEG-Hyal injection, the diameter of the stained spot did not significantly differ in both experimental groups (50 IU/kg and 500 IU/kg) from the control one (Table 5).

In experiments evaluating the indirect mast cell degranulation, it was found that the serum of animals which received PEG-Hyal at doses of 50 and 500 IU/kg did not cause a statistically significant change in the MCDI compared with the control group (Table 6), and the MCDI did not significantly change either in the absence or in the presence of PEG-Hyal. The MCDI in the presence of PEG-Hyal but without the addition of mouse serum was 0.04.

Таблица 2. Оценка влияния инстилляций ПЭГ-Гиал на состояние конъюнктивы глаза
Table 2. Assessment of the effect of PEG-Hyal instillations on the state of the conjunctiva

Группа Group	Время после инстилляций Time after instillation		
	15 мин / min	24 ч / h	48 ч / h
Контроль 1 (2% раствор ПЭГ) / Control 1 (2% PEG solution) ♂ ($n = 5$)	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.
ПЭГ-Гиал, доза 20.83 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 20.83 IU/kg ♂ ($n = 5$)	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.
ПЭГ-Гиал, доза 208.3 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 208.3 IU/kg ♂ ($n = 5$)	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.
Контроль 2 (2% раствор ПЭГ) / Control 2 (2% PEG solution) ♀ ($n = 5$)	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.
ПЭГ-Гиал, доза 20.83 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 20.83 IU/kg ♀ ($n = 5$)	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.
ПЭГ-Гиал, доза 208.3 ЕД/кг PEG-Hyal, dose 208.3 IU/kg ♀ ($n = 5$)	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.	н.и. / n.ch.

Примечание. н.и. – нет изменений.
 Note. n.ch. – no changes.

Таблица 3. Оценка влияния накожных аппликаций ПЭГ-Гиал на состояние кожных покровов морских свинок
Table 3. Evaluation of the effect of PEG-Hyal skin applications on the state of the guinea pigs' skin

Группа Group	Количество аппликаций Number of applications	
	10	20
Контроль 1 ♂ (2% раствор ПЭГ) / Control 1 ♂ (2% PEG solution) (n = 5)	–	–
ПЭГ-Гиал / PEG-Hyal ♂ (n = 5)	–	–
Контроль 2 ♀ (2% раствор ПЭГ) / Control 2 ♀ (2% PEG solution) (n = 5)	–	–
ПЭГ-Гиал / PEG-Hyal ♀ (n = 5)	–	–

П р и м е ч а н и е . «–» – отрицательная реакция.
 N o t e . «–» – negative reaction.

ций. Реакция кожи в опытной группе не отличалась от реакции в контрольной группе (табл. 3).

В экспериментах по изучению реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышах установлено, что достоверных различий индекса реакции ГЗТ в опытной группе мышей, получавших ПЭГ-Гиал с адъювантом Фрейнда, по сравнению с контрольной группой, получавших только адъювант Фрейнда, не наблюдалось через 6 и 24 ч после введения (табл. 4).

При изучении активной кожной анафилаксии показано, что после внутрикожного введения разрешающей инъекции ПЭГ-Гиал диаметр окрашенного пятна достоверно не отличался в обеих опытных группах (50 ЕД/кг и 500 ЕД/кг) от контрольной (табл. 5).

В экспериментах по изучению непрямо́й реакции дегрануляции тучных клеток установлено, что сыворотка животных, получавших ПЭГ-Гиал в дозах 50 и 500 ЕД/кг, не вызывала статистически значимого изменения ПДТК по сравнению с контрольной группой (табл. 6), причем ПДТК достоверно не изменялся как в отсутствии, так и в присутствии ПЭГ-Гиал. ПДТК в присутствии ПЭГ-Гиал без добавления сыворотки мышей составил 0.04.

Оценка алергизирующего действия ПЭГ-Гиал в реакции воспаления на конканавалин А

Evaluation of the allergenic potential of PEG-Hyal in the inflammatory response to concanavalin A showed that the course administration of the drug both at a dose of 50 IU/kg and at a dose of 500 IU/kg did not lead to a statistically significant difference in the IRI in the experimental and control groups (Table 7).

CONCLUSION

When studying the allergenic properties of PEG-Hyal in various experiments (anaphylactogenic activity, conjunctival challenge testing and cutaneous applications on guinea pigs; active cutaneous anaphylaxis, delayed-type hypersensitivity, indirect mast cell degranulation, cutaneous and inflammatory response to concanavalin A in mice), no significant differences were found between the control and experimental groups. Thus, PEG-Hyal does not have an allergenic potential in various routes of administration. This, firstly, significantly expands the possibilities of clinical use of PEG-Hyal, and, secondly, once again confirms that electron beam PEGylation of enzymes allows to achieve the effect of eluding of proteins from allergic response of immunocompetent cells.

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

Таблица 4. Оценка влияния ПЭГ-Гиал на интенсивность реакции ГЗТ
Table 4. Evaluation of the effect of PEG-Hyal on the intensity of the DTH

Группа Group	Индекс реакции ГЗТ / DTH index ($\bar{X} \pm m$)	
	через 6 ч / after 6 h	через 24 ч / after 24 h
Контроль (р-р Хенкса + адъювант Фрейнда) Control (Hanks' solution + Freund's adjuvant) (n = 5)	1.66 ± 0.53	2.42 ± 0.64
Опыт (ПЭГ-Гиал + адъювант Фрейнда) Experiment (PEG-Hyal + Freund's adjuvant) (n = 5)	7.58 ± 2.71	4.96 ± 1.19

П р и м е ч а н и е . ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа.
 N o t e . DTH – delayed-type hypersensitivity.

Таблица 5. Влияние введения ПЭГ-Гиал на активную кожную анафилаксию
Table 5. Effect of PEG-Hyal administration on active cutaneous anaphylaxis

Группа Group	Диаметр пятна (мм ²) ($\bar{X} \pm m$) при разрешающем введении ПЭГ-Гиал в дозе Spot diameter (mm ²) ($\bar{X} \pm m$) in challenge administration of PEG-Hyal at a dose of	
	0.5 ЕД / IU	1.0 ЕД / IU
Контроль (2% р-р ПЭГ) Control (2% PEG solution) (n = 5)	0.75 ± 0.19	1.06 ± 0.33
Опыт 1 (ПЭГ-Гиал, доза 50 ЕД/кг) Experiment 1 (PEG-Hyal, dose 50 IU/kg) (n = 5)	0.88 ± 0.18	2.19 ± 0.60
Опыт 2 (ПЭГ-Гиал, доза 500 ЕД/кг) Experiment 2 (PEG-Hyal, dose 500 IU/kg) (n = 5)	1.29 ± 0.26	2.0 ± 0.61

Таблица 6. Влияние введения ПЭГ-Гиал на реакцию дегрануляции тучных клеток
Table 6. Effect of PEG-Hyal administration on the mast cell degranulation

Группа (доноры сыворотки) Group (serum donors)	ПДТК ($\bar{X} \pm m$) в присутствии / MCDI ($\bar{X} \pm m$)	
	сыворотки for serum	сыворотки и ПЭГ-Гиал for serum and PEG-Hyal
Фон / Background (n = 5)	0.048 ± 0.005	0.046 ± 0.009
Контроль (2% р-р ПЭГ) / Control (2% solution PEG) (n = 5)	0.044 ± 0.008	0.050 ± 0.015
Опыт 1 (ПЭГ-Гиал, доза 50 ЕД/кг) Experiment 1 (PEG-Hyal, dose 50 IU/kg) (n = 5)	0.052 ± 0.010	0.060 ± 0.005
Опыт 2 (ПЭГ-Гиал, доза 500 ЕД/кг) Experiment 2 (PEG-Hyal, dose 500 IU/kg) (n = 5)	0.048 ± 0.010	0.046 ± 0.007

П р и м е ч а н и е . ПДТК – показатель дегрануляции тучных клеток.
N o t e . MCDI – mast cell degranulation index.

Таблица 7. Влияние введения ПЭГ-Гиал на индекс реакции (ИР) воспаления на конканавалин А
Table 7. Effect of PEG-Hyal administration on the inflammatory response index (IRI) to concanavalin A

Группа / Group	ИР / IRI ($\bar{X} \pm m$)
Контроль (2% р-р ПЭГ) / Control (2% solution PEG) (n = 5)	3.09 ± 0.59
Опыт 1 (ПЭГ-Гиал, доза 50 ЕД/кг) Experiment 1 (PEG-Hyal, dose 50 IU/kg) (n = 5)	3.25 ± 0.74
Опыт 2 (ПЭГ-Гиал, доза 500 ЕД/кг) Experiment 2 (PEG-Hyal, dose 500 IU/kg) (n = 5)	3.69 ± 0.87

показала, что курсовое введение препарата как в дозе 50 ЕД/кг, так и в дозе 500 ЕД/кг не приводило к статистически достоверной разнице по ИР в опытных и контрольной группах (табл. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении аллергизирующих свойств ПЭГ-Гиал в различных экспериментах (анафилактогенная активность, конъюнктивальное тестирование и накожные аппликации на морских свинках; активная кожная анафилаксия, реакция гиперчувствительности замедленного типа, реакция непрямого дегрануляции тучных клеток и реакция воспаления на конканавалин А

на мышцах) не было выявлено достоверных отличий между контрольными и опытными группами. Таким образом, ПЭГ-Гиал не обладает аллергизирующим действием при различных путях введения. Это обстоятельство, во-первых, существенно расширяет возможности клинического применения ПЭГ-Гиал, а во-вторых, еще раз подтверждает, что электронно-лучевое пегилирование ферментов позволяет достичь эффекта «ускользания» белков от аллергического ответа иммунокомпетентных клеток.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dunn A.L., Heavner J.E., Racz G., Day M. Hyaluronidase: a review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010;10(1):127-131. DOI: 10.1517/14712590903490382.
2. Jung H. Hyaluronidase: An overview of its properties, applications, and side effects // *Arch. Plast. Surg.* 2020;47(4):297-300. DOI: 10.5999/aps.2020.00752.
3. Kim M.S., Youn S., Na C.H., Shin B.S. Allergic reaction to hyaluronidase use after hyaluronic acid filler injection // *J. Cosmet. Laser Ther.* 2015;17(5):283-5. DOI: 10.3109/14764172.2015.1007069.
4. Sharma S.C., Lahiri A. Use of hyaluronidase in plastic surgery: a review // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2021;74(7):1610-1614. DOI: 10.1016/j.bjps.2021.03.125.
5. Mayor R., Gautam P., Agarwal M. et al. Hyaluronidase sensitivity: Our experience // *Indian J. Ophthalmol.* 2016;64(10):789-790. DOI: 10.4103/0301-4738.195008.
6. Ahluwalia H.S., Lukaris A., Lane C.M. Delayed allergic reaction to hyaluronidase: a rare sequel to cataract surgery // *Eye (Lond.)*. 2003;17(2):263-266. DOI: 10.1038/sj.eye.6700243.
7. Raichura N.D., Alam M.S., Jaichandran V.V. et al. Hyaluronidase allergy mimicking orbital cellulitis // *Orbit.* 2018;37(2):149-153. DOI: 10.1080/01676830.2017.1383465.
8. Murray G., Convery C., Walker L., Davies E. Guideline for the safe use of hyaluronidase in aesthetic medicine, including modified high-dose protocol // *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2021;14(8):E69-E75.
9. Wu L., Liu X., Jian X. et al. Delayed allergic hypersensitivity to hyaluronidase during the treatment of granulomatous hyaluronic acid reactions // *J. Cosmet. Dermatol.* 2018;17(6):991-995. DOI: 10.1111/jocd.12461.
10. Scolaro R.J., Crilly H.M., Maycock E.J. et al. Australian and New Zealand Anaesthetic Allergy Group perioperative anaphylaxis investigation guidelines // *Anaesth. Intensive Care.* 2017;45(5):543-555. DOI: 10.1177/0310057X1704500504.
11. 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.
12. Дыгай А.М., Першина О.В., Крупин В.А. и др. Изучение антифибротической активности модифицированной и нативной гиалуронидазы при пневмофиброзе // *Сибирский науч. мед. журн.* 2017;37(4):5-10.
13. Скурихин Е.Г., Першина О.В., Крупин В.А. и др. Эффекты и механизм действия пегилированной гиалуронидазы у мышей C57BL/6 в условиях блеомин-индуцированного фиброза легких // *Патогенез.* 2015;13(3):56-64.
14. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Гурто Р.В. и др. Влияние пегилированной эндо-β-N-ацетилгексозаминазы на гуморальные механизмы регуляции функций прогениторных клеток при хроническом гепатите // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины.* 2013;155(2):140-143.

REFERENCES

1. Dunn A.L., Heavner J.E., Racz G., Day M. Hyaluronidase: a review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010;10(1):127-131. DOI: 10.1517/14712590903490382.
2. Jung H. Hyaluronidase: An overview of its properties, applications, and side effects. *Arch. Plast. Surg.* 2020;47(4):297-300. DOI: 10.5999/aps.2020.00752.
3. Kim M.S., Youn S., Na C.H., Shin B.S. Allergic reaction to hyaluronidase use after hyaluronic acid filler injection. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2015;17(5):283-5. DOI: 10.3109/14764172.2015.1007069.
4. Sharma S.C., Lahiri A. Use of hyaluronidase in plastic surgery: a review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2021;74(7):1610-1614. DOI: 10.1016/j.bjps.2021.03.125.
5. Mayor R., Gautam P., Agarwal M. et al. Hyaluronidase sensitivity: Our experience. *Indian J. Ophthalmol.* 2016;64(10):789-790. DOI: 10.4103/0301-4738.195008.
6. Ahluwalia H.S., Lukaris A., Lane C.M. Delayed allergic reaction to hyaluronidase: a rare sequel to cataract surgery. *Eye (Lond.)*. 2003;17(2):263-266. DOI: 10.1038/sj.eye.6700243.
7. Raichura N.D., Alam M.S., Jaichandran V.V. et al. Hyaluronidase allergy mimicking orbital cellulitis. *Orbit.* 2018;37(2):149-153. DOI: 10.1080/01676830.2017.1383465.
8. Murray G., Convery C., Walker L., Davies E. Guideline for the safe use of hyaluronidase in aesthetic medicine, including modified high-dose protocol. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2021;14(8):E69-E75.
9. Wu L., Liu X., Jian X. et al. Delayed allergic hypersensitivity to hyaluronidase during the treatment of granulomatous hyaluronic acid reactions. *J. Cosmet. Dermatol.* 2018;17(6):991-995. DOI: 10.1111/jocd.12461.
10. Scolaro R.J., Crilly H.M., Maycock E.J. et al. Australian and New Zealand Anaesthetic Allergy Group perioperative anaphylaxis investigation guidelines. *Anaesth. Intensive Care.* 2017;45(5):543-555. DOI: 10.1177/0310057X1704500504.
11. Madonov P. G., Ershov K. I., Dubrov 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.)
12. Dygai A.M., Pershina O.V., Krupin V.A. et al. Study of antifibrotic activity of modified and native hyaluronidase at pulmonary fibrosis. *Siberian Scientific Medical Journal.* 2017;37(4):5-10. (In Russ.)
13. Skurihin E.G., Pershina O.V., Krupin V.A. et al. Effects and mechanisms of pegylated hyaluronidase in c57BL/6 mice under bleomycin induced pulmonary fibrosis. *Pathogenesis.* 2015;13(3):56-64. (In Russ.)
14. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Gurto R.V. et al. Effect of pegylated hyaluronate-endo-β-N-acetylhexosaminidase on humoral mechanisms regulating the functions of progenitor cells during chronic hepatitis. *Bulletin Experimental Biology and Medicine.* 2013;155(2):140-143. (In Russ.)
15. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. Method of stimulating liver stem cell differentiation in vitro

15. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Способ стимуляции дифференцировки стволовых клеток печени in vitro в тканеспецифичном направлении: Патент на изобретение RUS 2477752. 17.02.2012.
16. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Влияние иммобилизированной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидазы на чувствительность прогениторных клеток к регуляторным факторам // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011;1:47-50.
17. Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. Методические указания по оценке аллергизирующих свойств фармакологических веществ. М., 2000. С. 25–32.
18. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit // J. Immunol. 1960;85:469-477.
- in tissue-specific direction: Patent RUS 2477752. 17.02.2012. (In Russ.)
16. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. Effect of hyaluronidase immobilized using electron-beam synthesis nanotechnology on sensitivity of progenitor cells to regulatory factors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;151(1):150-153. DOI: 10.1007/s10517-011-1277-0.
17. Lyubimov B.I., Kovalenko L.P., Fedoseeva V.N. (2000). *Guidelines for the Evaluation of Allergenic Properties of Pharmacological Substances*. Moscow. P. 25–32. (In Russ.)
18. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol*. 1960;85:469-477.

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.

Швецова Александра Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий Института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: 0009-0002-7735-6032.

Шерстобоев Евгений Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом иммунофармакологии, заместитель директора по экспертизе доклинических исследований НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-6178-5329.

Жданов Вадим Вадимович – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-9516-0204.

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 of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 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 of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-41399-036x.

Alexandra M. Shvetsova – Junior Researcher, Pharmaceutical Technology Laboratory, Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0009-0002-7735-6032.

Evgeny Yu. Sherstoboev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Immunopharmacology, Deputy Director for Examination of Preclinical Research, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-6178-5329.

Vadim V. Zhdanov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-9516-0204.

Tatyana A. Drobysheva – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Departments of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1639-1841.

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

Дробышева Татьяна Александровна – канд. мед. наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1639-1841.

Фурсова Анжелла 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.

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.

Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-6311-5452.

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 of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

