

# Эффекты и механизм действия пегилированной гиалуронидазы у мышей C57BL/6 в условиях блеомицин-индуцированного фиброза легких

Скурихин Е.Г.<sup>1</sup>, Першина О.В.<sup>1</sup>, Крупин В.А.<sup>1</sup>, Резцова А.М.<sup>1</sup>, Ермакова Н.Н.<sup>1</sup>, Ермолаева Л.А.<sup>1</sup>, Хмелевская Е.С.<sup>1</sup>, Пахомова А.В.<sup>1</sup>, Пан Э.С.<sup>1</sup>, Мадонов П.Г.<sup>2</sup>, Шилова М.А.<sup>2</sup>, Дыгай А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — ФГБНУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга», ул. Ленина, 3, Томск, Россия, 634028

<sup>2</sup> — ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

В условиях блеомициновой травмы альвеолярного эпителия изучены эффекты пегилированной гиалуронидазы (пегГД) у мышей линии C57BL/6. пегГД представляет собой тестикулярную гиалуронидазу, которая была модифицирована активированным полиэтиленоксидом с помощью электронно-лучевого синтеза (ООО «Scientific Future Management», г.Новосибирск). Пролекарственный препарат пегилированная гиалуронидаза (пегГД) оказывает незначительное влияние на развитие воспалительной реакции в легких, сокращает площадь соединительной ткани в блеомициновых легких, при лечении уменьшается уровень гиалуроновой кислоты, гидроксипролина и общего коллагена в гомогенатах легких. Антифибротический эффект пегГД наблюдается при профилактическом и терапевтическом режиме введения, более выражен, чем у ГД. Препарат пегГД сокращает количество гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток в паренхиме легких больных животных, в то время как число мезенхимальных стволовых клеток возрастает. При этом регистрируется снижение клональной активности легочных прогениторных фибробластных клеток (КОЕ-Ф). Таким образом, пегГД — это потенциальный антифибротический агент для профилактики и терапии токсического фиброза легкого.

**Ключевые слова:** пегилированная гиалуронидаза, гемопоэтические стволовые клетки, прогениторные гемопоэтические клетки, мезенхимальные стволовые клетки, пневмофиброз

## Введение

Фиброз легкого включает в себя гетерогенную группу легочных расстройств, характеризующихся прогрессирующей и необратимой деструкцией архитектуры альвеолярного эпителия, вызванной образованием рубцов, что приводит к нарушению газообмена и, в конечном итоге, к смерти от дыхательной недостаточности [43]. Идиопатический фиброз легкого (ИФЛ) — наиболее тяжелая форма легочного фиброза с неизвестной этиологией. Потенциальными факторами риска ИФЛ выступают курение и воздействия окружающей среды (угольная, древесная, каменная и металлическая пыль, песок, диоксид кремния) [6, 7, 15, 19, 31, 35, 38, 42]. ИФЛ легких может развиваться как осложнение после вирусных инфекций, радиотерапии и химиотерапии, после воздействия аэрозольных токсинов окружающей среды [9, 12, 17, 24]. Длительное время ИФЛ протекает бессимптомно, однако в последующем неотвратимо приводит к инвалидизации и резкому снижению качества жизни пациента. Средняя продолжительность жизни после постановки диагноза пневмофиброз составляет 2–3 года, по другим данным, не более 6 лет [28, 34, 40]. Существующий набор лечебных мероприятий для ИФЛ ограничен и не эффективен. Клиническая практика сосредоточена преимущественно на лечении осложнений и поддерживающей терапии [25, 28].

Гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидаза — фермент из семейства гиалуронидаз. Специфическая активность гиалуронидаз опосредована расщеплением гиалуроновой кислоты на высокомолекулярные и низкомолекулярные фрагменты. На модели блеомицин-индуцированного пневмофиброза показано, что тестикулярная гиалуронидаза препятствует гибели клеток альвеолярного эпителия и развитию фиброза в легких у мышей [8]. Между тем, в силу ферментативного гидролиза концентрация ги-

лурунидазы в легких быстро уменьшается. Это приводит к восстановлению профибротической вязкости матрикса гиалуронана и, как следствие, прогрессии фиброза легких.

Ковалентное присоединение полиэтиленгликоля к интересующей фармакологически активной молекуле — пегилирование, стало устоявшейся формулой создания пролекарства [16, 18]. Наиболее часто используемым неионным полимером является полиэтиленоксид [26, 27]. Клинические эффекты пегилированных биологически активных пептидов превосходят соответствующие свойства немодифицированных молекул. Потенциал пегилированных препаратов улучшается за счет повышения растворимости в воде, устойчивости к действию ферментов, адресной доставки лекарственного препарата до мишени [26, 27]. Мы предполагаем, что сохранение гиалуронидазы в агрессивной среде возможно пегилированием.

Целью настоящего исследования было изучение действия пегилированной гиалуронидазы (пегГД) на фиброз легких у мышей C57BL/6 в условиях токсической травмы альвеолярного эпителия. Препарат пегГД представлял собой тестикулярную гиалуронидазу, которая была модифицирована активированным полиэтиленоксидом с помощью электронно-лучевого синтеза (ООО «Scientific Future Management», г.Новосибирск).

## Материал (объект) и методы исследования

Эксперименты выполнены на 985 мышках-самцах линии C57BL/6 в возрасте 8–10 недель. Животные 1 категории (конвенциональные линейные мыши) получены из питомника НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Содержание животных и дизайн экспериментов были одобрены этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Для моделирования токсической травмы альвеолярного эпителия использовали блеомицин (Blenoxane®; «Sao Paulo», Бразилия). Однократное повреждение лёгких — частично обратимый пневмофиброз, вызывали однократным интратрахеальным (ИТ) введением блеомицина (80 мкг / в 30 мкл NaCl 0,9% / мышь). Повторяющееся повреждение лёгких — необратимый пневмофиброз, вызывали однократной ИТ инстилляцией блеомицина (80 мкг / в 30 мкл NaCl 0,9% / мышь) с последующим (7, 14, 21, 28-й день эксперимента) интраназальным (ИН) назначением препарата (80 мкг / в 15 мкл NaCl 0,9% / мышь). Первое введение блеомицина принимали за 0 (нулевой) день эксперимента.

В условиях частично обратимого пневмофиброза 16 ЕД тестикулярной гиалуронидазы и 8 ЕД пегГД (бычья тестикулярная гиалуронидаза, полученная из животного сырья — семенников КРС), оба соединения ЗАО «Сибирский Центр фармакологии и Биотехнологии», г.Новосибирск) разводили в 18 мкл FBS и вводили ИН, внутривенно (ВВ) или внутривенно (ВЖ) на 1, 3, 7, 10-й дни эксперимента — фаза воспаления (профилактический режим). При необратимом пневмофиброзе пегГД (8 ЕД / 18 мкл FBS / мышь) и тестикулярную гиалуронидазу (16 ЕД / 18 мкл FBS / мышь) вводили ИН на 10—16, 18—23, 25—30, 36—42-й дни — периоды отложения фибротических масс (терапевтический режим).

Контрольным животным во всех сериях экспериментов в аналогичных условиях вводили эквивалентный объем физиологического раствора. Фоновые показатели получали при использовании интактных животных.

Гистологическое исследование ткани легких выполняли по стандартной методике, препараты окрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону [4, 5].

Экспрессию мембранных рецепторов анализировали с использованием мышинных моноклональных антител («BD Biosciences», США). В легких изучали «long-term» (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) и «short term» (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), прогениторные гемопоэтические клетки (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>), мезенхимальные стволовые клетки (CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup>) (МСК).

Иммуноферментным твердофазным методом с использованием набора для лабораторной диагностики мышей методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Cusabio Biotech CO., LTD, Китай) изучали уровни гидроксипролина, коллагена типа I, гиалуроновой кислоты и общего коллагена в гомогенате легкого.

Клональную активность CD45<sup>-</sup>-клеток легких определяли клональными методами в нашей модификации [1, 36]. Исследовали формирование колониеобразующих единиц фибробластного (КОЕ-Ф) типа.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики с использованием программы статистики SPSS 12,0 и пакета статистических программ «Statistica 8.0». Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее значение,  $m$  — стандартная ошибка среднего значения. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным в том случае, если вероятность их тождества была меньше 5% ( $P < 0,05$ ). Используя выборочные коэффициенты асимметрии и эксцесса, оценивали степень приближения закона распределения исследуемого признака к нормальному. В случаях нормального распределения признаков для статистической оценки применяли параметрический t-критерий Стьюдента. При больших отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок использовали непараметрический U-критерий Уилкоксона [2, 3].

### Результаты исследования

#### *Морфологическое исследование легкого при частично обратимом пневмофиброзе*

На рис. 1 представлена морфологическая картина правой доли легкого у мышей групп интактного контроля, у мышей с однократной травмой альвеолярного эпителия без лечения и при лечении с использованием ГД и пегГД. Окраска препаратов легких пикрофуксином по Ван-Гизону выявила, что ГД снижает количество соединительной ткани (до 66,5%) в блеомициновых легких у животных по сравнению с нелечеными больными животными на 14-й день эксперимента (табл. 1). пегГД уменьшает количество соединительной ткани на 7, 14, 21-й день.

#### *Морфологическое исследование легкого при необратимом пневмофиброзе*

Блеомицин воспроизводит многие типичные черты ИФЛ у человека. Такие критерии, как внутри-альвеолярные почки, интрамуральные включения коллагена и закрытие альвеолярного пространства присутствуют у пациентов с ИФЛ и у леченных блеомицином животных [41]. Между тем, аспект медленного и необратимого прогрессирования пневмофиброза у экспериментальных животных, получавших блеомицин однократно, невосп-

Таблица 1

**Содержание соединительной ткани в легких у мышей линии C57BL/6 (количество коллагеновых волокон от общей площади легочной ткани, %) ( $M \pm m$ )**

Группы		Интактный контроль (n = 10) 1,12 ± 0,03		
		Сроки эксперимента		
		7-й день	14-й день	21-й день
Интактный контроль (n = 10)		1,13 ± 0,07	1,14 ± 0,03	1,15 ± 0,06
Частично обратимый пневмофиброз (n = 10)		3,07 ± 0,09*	3,91 ± 0,07*	4,26 ± 0,14*
Профилактика частично обратимого пневмофиброза	Тестикулярная гиалуронидаза (n = 10)	3,05 ± 0,17*	2,60 ± 0,21* #	3,24 ± 0,07*
	пегГД (n = 10)	2,22 ± 0,12* #	2,12 ± 0,12* #	2,24 ± 0,18* #

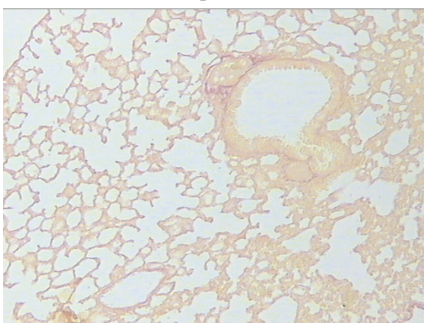
Примечание. \* — достоверность различия от контрольной группы ( $P < 0,05$ ); # — достоверность различия от частично обратимого пневмофиброза ( $P < 0,05$ )

производим [11, 20]. В клинике пациенты с ИФЛ представлены на этапе развернутой стадии болезни. Большинство потенциальных антифибротических соединений не оказывают ожидаемого эффекта при клинических испытаниях, либо их активность несопоставимо ниже, чем на животных моделях фиброза легкого [29]. Причиной такого положения дел выступает ограничение доклинических исследований потенциальных антифибротических соединений моделями однократного токсического поражения лёгких (частично обратимый пневмофиброз) и оценкой их эффективности в профилактических режимах введения. Таким образом, на первое место выходит поиск соединений, эффективных в условиях прогрессирования пневмофиброза. На модели повторяющейся травмы альвеолярного эпителия блеомицином (необратимый пневмофиброз) мы исследовали антифибротические эффекты пегГД при терапевтическом режиме введения.

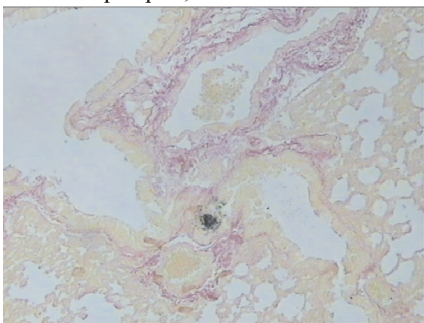
На рис. 2 представлена морфологическая картина правой доли легкого у мышей из групп интактного контроля, у мышей с повторяющейся травмой альвеолярного эпителия без лечения и при лечении препаратами ГД и пегГД. Препараты ГД и пегГД на 21-, 40-й дни эксперимента значительно уменьшают количество соединительной ткани в легких у животных с необратимым пневмофиброзом по сравнению с нелечеными больными животными. Как видно из табл. 2, лечение пегГД более эффективно по сравнению с ГД. После отмены лечения (60-й день) показатель в группах животных с ГД и пегГД повышается.

Эти данные показали, что в условиях однократной и повторяющейся травмы альвеолярного эпителия блеомицином введение пегГД препятствует развитию пневмофиброза. Эффект препарата наблюдался при профилактическом и терапевтическом режимах введения. Активность пегГД превосходит ГД.

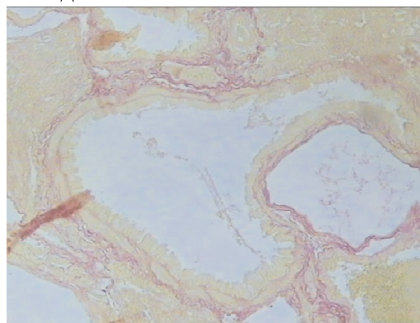
Интактный контроль



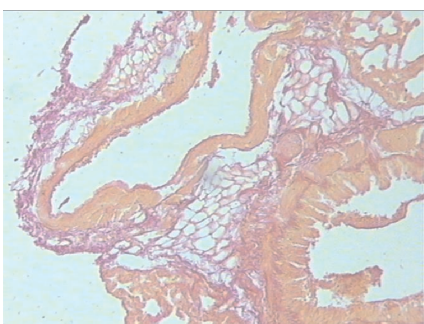
Пневмофиброз, 14-й день



Пневмофиброз, леченный пегГД, 14-й день



Пневмофиброз, 21-й день



Пневмофиброз, леченный пегГД, 21-й день

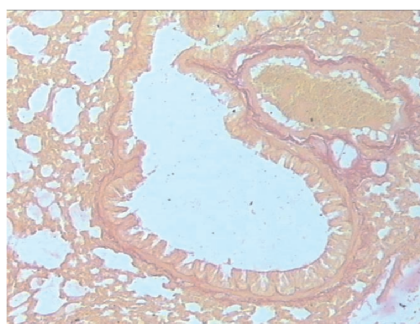


Рис. 1. Морфологическая картина лёгких у мышей интактного контроля и при частично обратимом пневмофиброзе, у мышей с частично обратимым пневмофиброзом, леченных интраназальным введением пегилированной гиалуронидазы в профилактическом режиме. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. ув. x100.

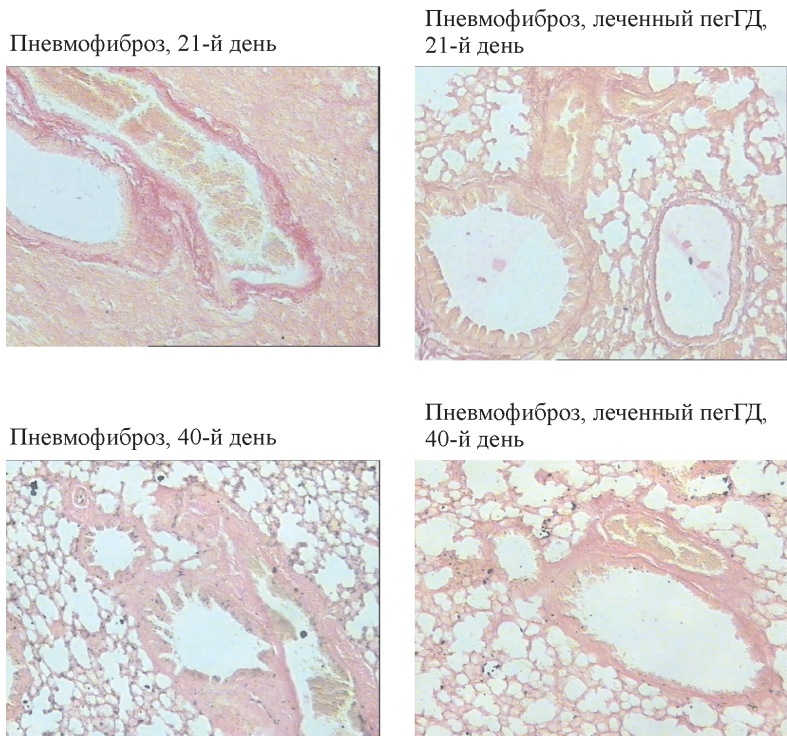


Рис. 2. Морфологическая картина лёгких у мышей интактного контроля и при необратимом пневмофиброзе, у мышей с необратимым пневмофиброзом, леченных интраназальным введением пегилированной гиалуронидазы в терапевтическом режиме. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. ув. x100.

*Иммуноферментный анализ гомогената правой доли легкого*

На модели частично обратимого пневмофиброза методом ИФА оценены уровни коллагена I типа, гидроксипролина, общего коллагена и гиалуроновой кислоты в гомогенатах правой доли легкого. Эффекты препаратов изучены в срок наибольшего изменения гистопатологических показателей легких при лечении частично обратимого пневмофиброза — 21-й день эксперимента. Все препараты вводили в профилактическом режиме.

На 21-й день эксперимента наблюдается значительное повышение уровней коллагена I типа (до 192%), гидроксипролина (298%), общего коллагена (до 182%) и гиалуроновой кислоты (до 352%) в гомогенатах легкого животных с частично обратимым пневмофиброзом по отношению к интактному контролю. ГД и пегГД снижают концентрацию коллагена I типа (до 83,3% и 80,96% соответ-

ственно), гидроксипролина (до 64,96% и 49,38% соответственно) и общего коллагена (до 78,06% и 65,29% соответственно) в блеомициновых легких по отношению к нелеченным больным животным (табл. 3). Дополнительно пегГД уменьшает уровень гиалуроновой кислоты в блеомициновых легких до 35,1% по отношению к нелеченым больным животным.

Таким образом, в условиях однократной травмы альвеолярного эпителия блеомицином пегГД снижает коллагена I типа, концентрацию гидроксипролина, общего коллагена и гиалуроновой кислоты.

*Иммунофенотипическая характеристика клеток легких*

На 7-й день эксперимента (развитие легочного воспаления [14]) в паренхиме легких у мышей интактного контроля и с частично обратимым пневмофиброзом, и у мышей с частично обратимым пневмофиброзом, леченных пегГД, изучали «long-term» и «short term» ГСК, прогени-

Таблица 2

**Содержание соединительной ткани в легких у мышей линии C57BL/6 (количество коллагеновых волокон от общей площади легочной ткани, %) (M ± m)**

Интактный контроль (n = 10) 1,12 ± 0,03				
Группы		Сроки эксперимента		
		21-й день	40-й день	60-й день
Контрольная группа (n = 10)		1,15 ± 0,06	1,12 ± 0,18	1,23 ± 0,16
Необратимый пневмофиброз (n = 10)		5,13 ± 0,75*	4,12 ± 0,40 *	5,96 ± 0,93 *
Лечение необратимого пневмофиброза	Тестикулярная гиалуронидаза (n = 10)	2,84 ± 0,32 * #	2,61 ± 0,41 * #	5,90 ± 0,79 *
	пегГД (n = 10)	1,87 ± 0,19 * #	2,09 ± 0,19 * #	4,78 ± 0,64 *

Примечание. \* — достоверность различия от контрольной группы (P < 0,05); # — достоверность различия от необратимого пневмофиброза (P < 0,05).

торные гемопоэтические клетки. Препарат вводили в профилактическом режиме.

На 7-й день после однократной интратрахеальной инстиляции блеомицина наблюдается достоверное увеличение количества Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>-клеток (до 171%), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-клеток (до 333%) и Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>-клеток (до 204%) в легких по отношению к интактному контролю (табл. 4). Препарат пегГД сокращают число «длительно живущих» ГСК (до 25%), «короткоживущих» ГСК (до 26,6%) и прогениторных гемопоэтических клеток (до 27,7%) в блеомициновых легких у мышей по отношению с нелечеными животными с частично обратимым пневмофиброзом.

На 21-й день эксперимента изучался иммунофенотип CD45<sup>neg</sup> клеток в соответствии со стандартами мезенхимальных стволовых клеток (МСК) легких у мышей C57BL/6 [23]. В легких у мышей интактного контроля и с частично обратимым пневмофиброзом и у мышей с частично обратимым пневмофиброзом, леченных пегГД, определяли CD45<sup>neg</sup> клетки, экспрессирующие на поверхности CD44, CD77, CD90, CD106 и негативные по CD31 и CD34.

В интактном контроле 1,7% клеток от всех CD45<sup>neg</sup> клеток легких составляют МСК (табл. 5). Во фракции CD45<sup>neg</sup> клеток легких у мышей с частично обратимым пневмофиброзом искомая популяция возрастала на 17,6% относительно интактного контроля. Под влиянием пегГД количество МСК повышается в 2,3 раза по отношению к нелеченым животным с пневмофиброзом.

Таким образом, в условиях однократной блеомициновой травмы альвеолярного эпителия пегГД сокращает популяцию легочных «long-term» и «short term» ГСК, прогениторных гемопоэтических клеток на седьмые сутки эксперимента. На 21-е сутки отмечается пегГД увеличивает количество МСК в легких больных животных.

#### Клональная активность адгезирующих клеток легких

В нашем исследовании однократная интратрахеальная инстиляция блеомицина вызывала генерацию адгезирующими мононуклеарами легких фибробластных колоний (КОЕ-Ф) на 21-й день эксперимента. Количество КОЕ-Ф с  $0,50 \pm 0,04 \times 10^5$  адгезирующих мононуклеаров в интактном контроле повышается до  $4,50 \pm 0,25 \times 10^5$  адгезиру-

Таблица 3

#### Уровень коллагена I типа, гидроксипролина, общего коллагена и гиалуроновой кислоты в гомогенатах правой доли легких у мышей линии C57BL/6 на 21-й день эксперимента (M ± m)

Группа		Коллаген I типа (ng)	Гидроксипролин (ng)	Общий коллаген (mkg)	Гиалуроновая кислота (mkg)
Интактный контроль (n = 10)		121,1 ± 11,7	2915 ± 240	69,6 ± 6,3	28054 ± 1901
Частично обратимый пневмофиброз (n = 10)		233,3 ± 22,4*	8714 ± 651*	127,2 ± 11,4*	98948 ± 3358 *
Профилактика частично обратимого пневмофиброза	Тестикулярная гиалуронидаза (n = 10)	194,6 ± 17,3	5661 ± 402#	99,3 ± 8,1	98611 ± 7754 *
	пегГД (n = 10)	188,9 ± 15,4	4303 ± 321 #	83,05 ± 5,5 #	34736 ± 2604 #

Примечание. \* — отмечена достоверность различия показателя от интактного контроля (P < 0,05); # — отмечена достоверность различия показателя от частично обратимого пневмофиброза (P < 0,05)

Таблица 4

#### Содержание ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток в паренхиме легких у мышей линии C57BL/6 на 7-й день эксперимента (M ± m)

Группы		CD34- ГСК	CD34+ ГСК	Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-kit <sup>+</sup> клетки
Интактный контроль (n = 10)		0,07 ± 0,005	0,018 ± 0,001	0,088 ± 0,007
Частично обратимый пневмофиброз (n = 10)		0,12 ± 0,01 *	0,06 ± 0,005 *	0,18 ± 0,01 *
Профилактика частично обратимого пневмофиброза	пегГД (n = 10)	0,03 ± 0,002 * #	0,016 ± 0,001 #	0,05 ± 0,02 * #

Примечание. \* — отмечена достоверность различия (P < 0,05) показателя от интактного контроля; # — отмечена достоверность различия (P < 0,05) показателя от частично обратимого пневмофиброза

Таблица 5

#### Содержание клеток с МСК-подобным фенотипом (% от всех выделенных CD45<sup>-</sup> клеток) в паренхиме легких у мышей линии C57BL/6 на 21-й день эксперимента (M ± m)

Группы		МСК (CD31 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , CD45 <sup>-</sup> , CD44 <sup>+</sup> , CD73 <sup>+</sup> , CD90 <sup>+</sup> , CD106 <sup>+</sup> )
Интактный контроль (n = 10)		1,7 ± 0,1
Частично обратимый пневмофиброз (n = 10)		2,0 ± 0,1
Лечение частично обратимого пневмофиброза	пегГД (n = 10)	4,6 ± 0,2 * #

Примечание. \* — отмечена достоверность различия (P < 0,05) показателя от интактного контроля; # — отмечена достоверность различия (P < 0,05) показателя от частично обратимого пневмофиброза без профилактики

щих моноклеаров у мышей в группе частично обратимого пневмофиброза ( $P < 0,05$ ). Лечение пегГД оказывает достоверное ( $P < 0,05$ ) супрессирующее действие на клональную активность легочных адгезирующих клеток у мышей с пневмофиброзом. В образцах клеток легких мышей опытной группы 3 число КОЕ-Ф составляет  $2,50 \pm 0,25 \times 10^5$  адгезирующих моноклеаров.

Итак, пегГД уменьшает рост КОЕ-Ф в культурах адгезирующих клеток легких у мышей при частично обратимом пневмофиброзе.

### Обсуждение

Полученные результаты морфологических исследований и ИФА позволили нам сделать следующие выводы. Во-первых, интраназальное введение пегГД в профилактическом режиме снижает интенсивность деструктивных процессов и препятствует отложению фибротических масс в паренхиме легких у мышей линии С57ВL/6 при частично обратимом пневмофиброзе. Во-вторых, пегГД проявляет значительную антифибротическую активность при необратимом пневмофиброзе. Профилактический и лечебный эффекты у пегГД более выражены, чем у ГД.

При блеомицин-индуцированном пневмофиброзе концентрация гиалуроновой кислоты в легких экспериментальных животных увеличивается в разы [8]. Это обусловлено повреждением паренхимы и воспалением [13, 22, 33]. Повышение концентрации гиалуроновой кислоты обеспечивается стромальными и эпителиальными клетками [30]. Гиалуроновая кислота синтезируется и «выдавливается» из клетки через плазматическую мембрану в межклеточное пространство. Из-за сильного отрицательного заряда карбоксильных групп молекулы гиалуроновой кислоты взаимно отталкиваются, в водных растворителях полимер занимает неоправданно большой объем. Сформированные «полости» занимают молекулами воды. Возникающая структура обеспечивает устойчивость и пластичность тканей, а повышение внутреннего давления приводит к физическому разделению структуры гиалуронана и образованию так называемых «автомобильных дорог» (пространство для миграции клеток) [32, 39], в том числе для стволовых клеток [10, 21]. По результатам настоящего исследования, однократная интратрахеальная инстилляционная блеомицина повышает уровень гиалуроновой кислоты и количество незрелых клеток («long-term» ГСК, «short term» ГСК, прогениторные гемопоэтические клетки, МСК) в паренхиме легких. Как было продемонстрировано ранее, ГСК и прогениторные гемопоэтические клетки поддерживают воспаление через паракринные механизмы, МСК дифференцируются в фибробласты

(основной продуцент коллагена в легких) и таким образом участвуют в развитии фиброза [36, 37].

Вводимые интраназально препараты пегГД и ГД снижают концентрацию гиалуроновой кислоты в легких животных с частично обратимым пневмофиброзом на 7-й день эксперимента (табл. 6). Изменяется структурно-пространственная организация матрикса гиалуронана, характерная для блеомицинового пневмофиброза. Это сопровождается нарушением инфильтрации паренхимы легких гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (табл. 4).

На 21-й день концентрация гиалуроновой кислоты уменьшается только при назначении пегГД (более чем в 2,8 раза), ГД не влияет на высокий уровень гиалуроновой кислоты у больных животных (табл. 3). С нашей точки зрения, полиэтиленоксид препятствует деградации гиалуронидазы и, тем самым, обеспечивает длительное изменение физико-химических свойств профибротического матрикса гиалуронана в паренхиме легких. Подтверждением этому выступает снижение скорости деградации пегГД в легких интактных животных. После введения пегГД высокий уровень гиалуронидазы в гомогенатах легких регистрируется в течение 5 часов. Тестикулярная гиалуронидаза определяется в первые 10–15 мин после инстилляции. Далее ее концентрация катастрофически падает.

При назначении пегГД в легочной ткани увеличивается количество таких CD45<sup>+</sup>-клеток, как МСК, к 21-му дню. Напрашивается вывод об активации мезенхимальной составляющей фиброгенеза, в частности дифференцировки МСК в фиброциты [37]. Однако в этот период гистопатологические показатели легких улучшаются. Одновременно уменьшается уровень коллагена I типа и гидроксипролина. Ранее Vitencourt C.S. et al. (2011) показали, что при блеомицин-индуцированном пневмофиброзе тестикулярная гиалуронидаза увеличивает количество МСК бронхо-альвеолярного пространства. Блокада фиброза и нарушение отложения коллагена на фоне расширения пула МСК авторы объяснили мезенхимально-эпителиальным переходом и снижением продукции трансформирующего фактора роста (transforming growth factor — TGF- $\beta$ ) [37]. Подобный механизм, вероятно, реализуется и в результате действия пегГД. В популяцию CD45<sup>+</sup>-клеток входят не только МСК. Отсутствие рецептора характеризует стволовые клетки бронхоиол, которые определяются как CD45<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, SCA-1low и AFlow. В связи с этим мы полагаем, что лечение пневмофиброза препаратом пегГД может стимулировать процессы регенерации, связанные с восстановлением эпителия легких. Падение клональной активности фибробластных КОЕ (CD45<sup>+</sup>) в фиброзированных легких при назначении пегГД дает основа-

Таблица 6

Уровень гиалуроновой кислоты в гомогенатах правой доли легких у мышей линии С57ВL/6 на 7-й день эксперимента ( $M \pm m$ )

Группа		Гиалуроновая кислота (нг)
Интактный контроль (n = 10)		66,25 ± 5,41
Частично обратимый пневмофиброз (n = 10)		107,65 ± 8,52 *
Профилактика частично обратимого пневмофиброза	Тестикулярная гиалуронидаза (n = 10)	72,13 ± 5,23 #
	пегГД (n = 10)	68,08 ± 4,78 #

Примечание. \* — отмечена достоверность различия показателя от интактного контроля ( $P < 0,05$ ); # — отмечена достоверность различия показателя от частично обратимого пневмофиброза ( $P < 0,05$ )

ние предполагать существование ингибирующего влияния пегилированного фермента на прогениторные фибробластные клетки (предшественники стромальных клеток).

Таким образом, представленные данные морфологических исследований, ИФА, оценки поверхностных маркеров указывают на состоятельность гипотезы о перспективности изменения структурно-пространственной организации матрикса гиалуронана фиброзированных легких при использовании пегГД в лечении фиброза легких.

### Выводы

1. В условиях моделирования однократной и повторяющейся блеомициновой травмы альвеолярного эпителия пегГД препятствует развитию фиброза легкого у мышей линии C57BL/6. пегГД демонстрирует высокую антифибротическую активность при профилактическом и терапевтическом режимах введения. Активность пегГД превосходит эффекты ГД.

2. В условиях моделирования однократной блеомициновой травмы препарат пегГД оказывает регуляторное влияние на легочные «long-term» и «short term» ГСК, прогениторные гемопоэтические клетки, МСК и прогениторные фибробластные клетки.

### Список литературы

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. — Томск, 1992. — 264 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
3. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика: Учеб. пособие для вузов. — М.: Высш. шк., 2002. — 479 с.
4. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М.: Мир, 1969. — 646 с.
5. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. — СПб.: Медицина, 1969. — 423 с.
6. Banks D.E. Coal workers' pneumoconiosis. In *Interstitial lung disease* / Ed. by Schwarz M.I., King T.E. 4th edition. — Ontario (Canada): BC Decker; 2003. — P. 402—417.
7. Baumgartner K.B., Samet J.M., Coultas D.B., Stidley C.A., Hunt W.C., Colby T.V. et al. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study // *Am. J. Epidemiol.* — 2000. — Aug. 15. — Vol. 152(4). — P. 307—315. PMID: 10968375
8. Bitencourt C.S., Pereira P.A., Ramos S.G., Sampaio S.V., Arantes E.C., Aronoff D.M. et al. Hyaluronidase recruits mesenchymal-like cells to the lung and ameliorates fibrosis // *Fibrogenesis & Tissue Repair.* — 2011. — 4(1). — P. 3. doi: 10.1186/1755-1536-4-3
9. Chen J., Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics // *Nat. Rev. Cancer.* — 2005. — Feb. — 5(2). — P. 102—112. PMID: 15685195
10. Christophis C., Taubert I., Meseck G.R., Schubert M., Grunze M., Ho A.D. et al. Shear stress regulates adhesion and rolling of CD44+ leukemic and hematopoietic progenitor cells on hyaluronan // *Biophysic. Journal.* — 2011. — Vol. 101(3). — P. 585—593. doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.045 PMID: 21806926
11. Chua F., Gauldie J., Laurent G.J. Pulmonary fibrosis: searching for model answers // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 33(1). — P. 9—13. PMID: 15964990
12. Denham J.W., Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury—a complex 'wound' // *Radiother. Oncol.* — 2002. — May. — Vol. 63(2). — P. 129—145. PMID: 12063002
13. Dentener M.A., Vernooij J.H., Hendriks S., Wouters E.F. Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation // *Thorax.* — 2005. — Feb. — Vol. 60(2). — P. 114—119. PMID: 15681498
14. Dygai A.M., Skurikhin E.G., Andreeva T.V., Ermolaeva L.A., Khmelevskaya E.S., Pershina O.V. et al. Reactions of the blood system and stem cells in bleomycin-induced model of lung fibrosis // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2011. — Dec. — Vol. 152(2). — P. 173—176. doi: 10.1007/s10517-011-1480-z PMID: 22808452
15. Gustafson T., Dahlman-Hoeglund A., Nilsson K., Strom K., Tornling G., Toren K. Occupational exposure and severe pulmonary fibrosis // *Respir. Med.* — 2007. — Oct. — Vol. 101(10). — P. 2207—2212. PMID: 17628464
16. Filpula D., Zhao H. Releasable PEGylation of proteins with customized linkers // *Advanced Drug Delivery Reviews.* — 2008. — Vol. 60(1). — P. 29—49. PMID: 17884239
17. Fubini B., Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis // *Free Radic. Biol. Med.* — 2003. — Vol. 34. — P. 1507—1516. PMID: 12788471
18. Hinds K.D. Protein conjugation, cross-linking, and PEGylation: biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids / Ed. by Mahato R.I. — CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2005. — P. 119—185.
19. Hubbard R., Cooper M., Antoniak M., Venn A., Khan S., Johnston I. et al. Risk of cryptogenic fibrosing alveolitis in metal workers // *Lancet.* — 2000. — Feb. 5. — Vol. 355(9202). — P. 466—467. PMID: 10841131
20. Izbicki G., Segel M.J., Christensen T.G., Conner M.W., Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis // *Int. J. Exp. Pathol.* — 2002. — Vol. 83(3). — P. 111—119. PMID: 12383190
21. Jha A.K., Xu X., Duncan R.L., Jia X. Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks // *Biomaterials.* — 2011. — Vol. 32(10). — P. 2466—2478. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.024 PMID: 21216457
22. Jiang D., Liang J., Noble W.P. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2007. — Vol. 23. — P. 435—461. PMID: 17506690
23. Jung D., Garat C., West J., Thorn N., Chow K., Cleaver T. et al. The Pathology of Bleomycin induced Fibrosis is Associated with Loss of Resident Lung Mesenchymal Stem cells which Regulate Effector T-cell Proliferation // *Stem Cells.* — 2011. — Apr. — Vol. 29(4). — P. 725—735. doi: 10.1002/stem.604 PMID: 21312316
24. Kelly B.G., Lok S.S., Hasleton P.S., Egan J.J., Stewart J.P. A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2002. — Aug. 15. — Vol. 166(4). — P. 510—513. PMID: 12186829
25. Khalil N., O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment // *CMAJ.* — 2004. — Jul. 20. — Vol. 171(2). — P. 153—160. PMID: 15262886
26. Khandare J., Minko T. Polymer-drug conjugates: progress in polymeric prodrugs // *Progress in Polymer Science.* — 2006. — Vol. 31(4). — P. 359—397.
27. Knop K., Hoogenboom R., Fischer D., Schubert U.S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives // *Angewandte Chemie-International Edition.* — 2010. — Vol. 49(36). — P. 6288—6308. doi: 10.1002/anie.200902672 PMID: 20648499
28. Mahendran S., Sethi T. Treatments in idiopathic pulmonary fibrosis: time for a more targeted approach? // *QJM.* — 2012. — Oct. — Vol. 105(10). — P. 929—934. PMID: 22647761
29. Moeller A., Ask K., Warburton D., Gauldie J., Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2008. — Vol. 40(3). — P. 362—382. doi: 10.1016/j.biocel.2007.08.011 PMID: 17936056
30. Pasonen-Seppanen S., Karvinen S., Torronen K. et al. EGF upregulates, whereas TGF beta down-regulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation // *J. Invest. Dermatol.* — 2003. — Vol. 120. — P. 1038—1044.
31. Pinheiro G.A., Antao V.C., Wood J.M., Wassell J.T. Occupational risks for idiopathic pulmonary fibrosis mortality in the United States // *Int. J. Occup. Environ. Health.* — 2008. — Apr.—Jun. — Vol. 14(2). — P. 117—123. PMID: 18507288
32. Pratt R.M., Larsen M.A., Johnston M.C. Migration of cranial neural crest cells in a cell-free hyaluronate-rich matrix // *Developmental Biology.* — 1975. — Vol. 44(2). — P. 298—305. PMID: 1132595
33. Savani R.C., Hou G., Liu P., Wang C., Simons E., Grimm P.C. et al. A role for hyaluronan in macrophage accumulation and collagen deposition after bleomycin-induced lung injury // *Am. J.*

Respir. Cell Mol. Biol. — 2000. — Oct. — Vol. 23(4). — P. 475—484. PMID: 11017912

34. Selman M., King T.E., Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy // *Ann. Intern. Med.* — 2001. — Jan. 16. — Vol. 134(2). — P. 136—151. PMID: 11177318

35. Steele M., Peterson M.W., Schwarz D.A. Asbestosis and asbestos-induced pleural fibrosis. In *Interstitial lung disease* / Ed. by Schwarz M.I., King T.E. 4th edition. — Ontario (Canada), 2003. — P. 418—434.

36. Skurikhin E.G., Pershina O.V., Khmelevskaya E.S., Ermakova N.N., Reztsova A.M., Krupin V.A. et al. Modulation of Stem and Progenitor Cells and Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Spiropone in Mice // *J. Stem Cell. Res. Ther.* — 2014. — 4. — P. 210. doi: 10.4172/2157-7633.1000210

37. Skurikhin E.G., Khmelevskaya E.S., Pershina O.V., Ermakova N.N., Krupin V.A., Ermolaeva L.A. et al. Anti-fibrotic Effect of Reserpine on Lung Fibrosis: Stem Cells in the Pathogenesis of Pneumofibrosis // *The Open Conference Proceedings Journal.* — 2013. — 4. — P. 31—46. doi: 10.2174/2210289201304010031

38. Taskar V.S., Coultas D.B. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? // *Proc. Am. Thorac. Soc.* — 2006. — Jun. — 3(4). — P. 293—298. PMID: 16738192

39. Toole B.P., Trelstad R.L. Hyaluronate production and removal during corneal development in the chick // *Developmental Biology.* — 1971. — Vol. 26(1). — P. 28—35. PMID: 5111769

40. Tzilas V., Koti A., Papandrinopoulou D., Tsoukalas G. Prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Med. Sci.* — 2009. — Dec. — Vol. 338(6). — P. 481—485. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3181ad5984 PMID: 19826245

41. Usuki J., Fukuda Y. Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats // *Pathol. Int.* — 1995. — Vol. 45. — P. 552—564. PMID: 7496500

42. Weissman D.N. Silicosis. In *Interstitial lung disease* / Ed. by Schwarz M.I., King T.E. 4th edition. — Ontario (Canada): BC Decker, 2003. — P. 387—401.

43. Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis // *J. Exp. Med.* — 2011. — Jul. 4. — Vol. 208(7). — P. 1339—1350. doi: 10.1084/jem.20110551 PMID: 21727191

*Поступила 07.09.2015*

## References

1. Gol'dberg E.D., Dygaj A.M., Shahov V.P. *Metody kul'tury tkani v gematologii.* — Tomsk, 1992. — 264 s.

2. Glanc S. *Mediko-biologicheskaja statistika / Per. s angl. — M.: Praktika, 1998. — 459 s.*

3. Gmurman V.E. *Teoriya veroyatnostej i matematicheskaja statistika: Ucheb. posobie dlja vuzov.* — M.: Vyssh. shk., 2002. — 479 s.

4. Lilli R. *Patogistologicheskaja tehnika i prakticheskaja gistohimija.* — M.: Mir, 1969. — 646 s.

5. Merkulov G.A. *Kurs patologistologicheskoy tehniki.* — SPb.: Medicina, 1969. — 423 s.

6. Banks D.E. Coal workers' pneumoconiosis. In *Interstitial lung disease* / Ed. by Schwarz M.I., King T.E. 4th edition. — Ontario (Canada): BC Decker, 2003. — P. 402—417.

7. Baumgartner K.B., Samet J.M., Coultas D.B., Stidley C.A., Hunt W.C., Colby T.V. et al. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study // *Am. J. Epidemiol.* — 2000. — Aug. 15. — Vol. 152(4). — P. 307—315. PMID: 10968375

8. Bitencourt C.S., Pereira P.A., Ramos S.G., Sampaio S.V., Arantes E.C., Aronoff D.M. et al. Hyaluronidase recruits mesenchymal-like cells to the lung and ameliorates fibrosis // *Fibrogenesis & Tissue Repair.* — 2011. — 4(1). — P. 3. doi: 10.1186/1755-1536-4-3

9. Chen J., Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics // *Nat. Rev. Cancer.* — 2005. — Feb. — 5(2). — P. 102—112. PMID: 15685195

10. Christophis C., Taubert I., Meseck G.R., Schubert M., Grunze M., Ho A.D. et al. Shear stress regulates adhesion and rolling of CD44+ leukemic and hematopoietic progenitor cells on hyaluronan // *Biophysic. Journal.* — 2011. — Vol. 101(3). — P. 585—593. doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.045 PMID: 21806926

11. Chua F., Gaudie J., Laurent G.J. Pulmonary fibrosis: searching for model answers // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 33(1). — P. 9—13. PMID: 15964990

12. Denham J.W., Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury—a complex 'wound' // *Radiother. Oncol.* — 2002. — May. — Vol. 63(2). — P. 129—145. PMID: 12063002

13. Dentener M.A., Vernooij J.H., Hendriks S., Wouters E.F. Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation // *Thorax.* — 2005. — Feb. — Vol. 60(2). — P. 114—119. PMID: 15681498

14. Dygai A.M., Skurikhin E.G., Andreeva T.V., Ermolaeva L.A., Khmelevskaya E.S., Pershina O.V. et al. Reactions of the blood system and stem cells in bleomycin-induced model of lung fibrosis // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2011. — Dec. — Vol. 152(2). — P. 173—176. doi: 10.1007/s10517-011-1480-z PMID: 22808452

15. Gustafson T., Dahlman-Hoeglund A., Nilsson K., Strom K., Tornling G., Toren K. Occupational exposure and severe pulmonary fibrosis // *Respir. Med.* — 2007. — Oct. — Vol. 101(10). — P. 2207—2212. PMID: 17628464

16. Filpula D., Zhao H. Releasable PEGylation of proteins with customized linkers // *Advanced Drug Delivery Reviews.* — 2008. — Vol. 60(1). — P. 29—49. PMID: 17884239

17. Fubini B., Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis // *Free Radic. Biol. Med.* — 2003. — Vol. 34. — P. 1507—1516. PMID: 12788471

18. Hinds K.D. Protein conjugation, cross-linking, and PEGylation: biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids / Ed. by Mahato R.I. — CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2005. — P. 119—185.

19. Hubbard R., Cooper M., Antoniak M., Venn A., Khan S., Johnston I. et al. Risk of cryptogenic fibrosing alveolitis in metal workers // *Lancet.* — 2000. — Feb. 5. — Vol. 355(9202). — P. 466—467. PMID: 10841131

20. Izbicki G., Segel M.J., Christensen T.G., Conner M.W., Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis // *Int. J. Exp. Pathol.* — 2002. — Vol. 83(3). — P. 111—119. PMID: 12383190

21. Jha A.K., Xu X., Duncan R.L., Jia X. Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks // *Biomaterials.* — 2011. — Vol. 32(10). — P. 2466—2478. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.024 PMID: 21216457

22. Jiang D., Liang J., Noble W.P. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2007. — Vol. 23. — P. 435—461. PMID: 17506690

23. Jung D., Garat C., West J., Thorn N., Chow K., Cleaver T. et al. The Pathology of Bleomycin induced Fibrosis is Associated with Loss of Resident Lung Mesenchymal Stem cells which Regulate Effector T-cell Proliferation // *Stem Cells.* — 2011. — Apr. — Vol. 29(4). — P. 725—735. doi: 10.1002/stem.604 PMID: 21312316

24. Kelly B.G., Lok S.S., Hasleton P.S., Egan J.J., Stewart J.P. A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2002. — Aug. 15. — Vol. 166(4). — P. 510—513. PMID: 12186829

25. Khalil N., O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment // *CMAJ.* — 2004. — Jul. 20. — Vol. 171(2). — P. 153—160. PMID: 15262886

26. Khandare J., Minko T. Polymer-drug conjugates: progress in polymeric prodrugs // *Progress in Polymer Science.* — 2006. — Vol. 31(4). — P. 359—397.

27. Knop K., Hoogenboom R., Fischer D., Schubert U.S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives // *Angewandte Chemie-International Edition.* — 2010. — Vol. 49(36). — P. 6288—6308. doi: 10.1002/anie.200902672 PMID: 20648499

28. Mahendran S., Sethi T. Treatments in idiopathic pulmonary fibrosis: time for a more targeted approach? // *QJM.* — 2012. — Oct. — Vol. 105(10). — P. 929—934. PMID: 22647761

29. Moeller A., Ask K., Warburton D., Gaudie J., Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2008. — Vol. 40(3). — P. 362—382. doi: 10.1016/j.biocel.2007.08.011 PMID: 17936056

30. Pasonen-Seppanen S., Karvinen S., Torronen K. et al. EGF upregulates, whereas TGF beta down-regulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation // *J. Invest. Dermatol.* — 2003. — Vol. 120. — P. 1038—1044.



31. Pinheiro G.A., Antao V.C., Wood J.M., Wassell J.T. Occupational risks for idiopathic pulmonary fibrosis mortality in the United States // *Int. J. Occup. Environ. Health.* — 2008. — Apr.—Jun. — Vol. 14(2). — P. 117—123. PMID: 18507288
32. Pratt R.M., Larsen M.A., Johnston M.C. Migration of cranial neural crest cells in a cell-free hyaluronate-rich matrix // *Developmental Biology.* — 1975. — Vol. 44(2). — P. 298—305. PMID: 1132595
33. Savani R.C., Hou G., Liu P., Wang C., Simons E., Grimm P.C. et al. A role for hyaluronan in macrophage accumulation and collagen deposition after bleomycin-induced lung injury // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2000. — Oct. — Vol. 23(4). — P. 475—484. PMID: 11017912
34. Selman M., King T.E., Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy // *Ann. Intern. Med.* — 2001. — Jan. 16. — Vol. 134(2). — P. 136—151. PMID: 11177318
35. Steele M., Peterson M.W., Schwarz D.A. Asbestosis and asbestos-induced pleural fibrosis. In *Interstitial lung disease* / Ed. by Schwarz M.I., King T.E. 4th edition. — Ontario (Canada), 2003. — P. 418—434.
36. Skurikhin E.G., Pershina O.V., Khmelevskaya E.S., Ermakova N.N., Reztsova A.M., Krupin V.A. et al. Modulation of Stem and Progenitor Cells and Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Spiperone in Mice // *J. Stem Cell. Res. Ther.* — 2014. — 4. — P. 210. doi: 10.4172/2157-7633.1000210
37. Skurikhin E.G., Khmelevskaya E.S., Pershina O.V., Ermakova N.N., Krupin V.A., Ermolaeva L.A. et al. Anti-fibrotic Effect of Reserpine on Lung Fibrosis: Stem Cells in the Pathogenesis of Pneumofibrosis // *The Open Conference Proceedings Journal.* — 2013. — 4. — P. 31—46. doi: 10.2174/2210289201304010031
38. Taskar V.S., Coultas D.B. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? // *Proc. Am. Thorac. Soc.* — 2006. — Jun. — 3(4). — P. 293—298. PMID: 16738192
39. Toole B.P., Trelstad R.L. Hyaluronate production and removal during corneal development in the chick // *Developmental Biology.* — 1971. — Vol. 26(1). — P. 28—35. PMID: 5111769
40. Tzilas V., Koti A., Papandrinopoulou D., Tsoukalas G. Prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Med. Sci.* — 2009. — Dec. — Vol. 338(6). — P. 481—485. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3181ad5984 PMID: 19826245
41. Usuki J., Fukuda Y. Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats // *Pathol. Int.* — 1995. — Vol. 45. — P. 552—564. PMID: 7496500
42. Weissman D.N. Silicosis. In *Interstitial lung disease* / Ed. by Schwarz M.I., King T.E. 4th edition. — Ontario (Canada): BC Decker, 2003. — P. 387—401.
43. Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis // *J. Exp. Med.* — 2011. — Jul. 4. — Vol. 208(7). — P. 1339—1350. doi: 10.1084/jem.20110551 PMID: 21727191

Received 07.09.2015

## **Effects and mechanisms of pegylated hyaluronidase in C57BL/6 mice under bleomycin induced pulmonary fibrosis**

**Skurikhin E.G.<sup>1</sup>, Pershina O.V.<sup>1</sup>, Krupin V.A.<sup>1</sup>, Reztsova A.M.<sup>1</sup>, Ermakova N.N.<sup>1</sup>, Ermolaeva L.A.<sup>1</sup>, Khmelevskaya E.S.<sup>1</sup>, Pakhomov A.V.<sup>1</sup>, Pan E.S.<sup>1</sup>, Madonov P.G.<sup>2</sup>, Shilova M.A.<sup>2</sup>, Dygay A.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> — Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D.Goldberg, 634028, Tomsk, Lenin Avenue, 3 mmu@pharm.tsu.ru

<sup>2</sup> — State Educational Institution of Higher Professional Education Novosibirsk State Medical University of the Russian Health Ministry

*The effects of pegylated hyaluronidase (pegGD) were studied in mice C57BL/6 under the bleomycin injury of alveolar epithelium. pegGD is a testicular hyaluronidase, which had been modified by activated polyethylene oxide using electron-beam synthesis (LTD «Scientific Future Management», Novosibirsk). pegGD has a little effect on the development of inflammatory response in lungs, reduces the area of connective tissue in bleomycin lungs, the level of hyaluronic acid, hydroxyproline and general collagen is decreased in lung homogenates under the treatment. Antifibrotic effect of pegGD is observed under prophylactic and therapeutic mode of administration and is more pronounced than GD has. pegGD reduces the number of hematopoietic stem and progenitor cells in the lung parenchyma of sick animals, while the number of mesenchymal stem cells is increased. The reduction of clonal activity of pulmonary progenitor fibroblast cells is recorded in the same time. Thus, pegGD is a potential antifibrotic agent for the prevention and treatment of toxic lung fibrosis.*

**Keywords:** pegylated hyaluronidase, hematopoietic stem cells, hematopoietic progenitor cells, mesenchymal stem cells, pneumofibrosis