

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Есина Т.И., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

Резюме. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) представляет собой миелопоэтический фактор роста, который оказывает плеiotропное действие не только на дифференцировку незрелых клеток-предшественников в полиморфноядерные нейтрофилы, моноциты/макрофаги и дендритные клетки, но и контролирует функционирование дифференцированных клеток. В настоящее время GM-CSF исследуется в клинических испытаниях в качестве иммуномодулятора и адьюванта. Однако широкий спектр биологической активности и нередко парадоксальные эффекты данного цитокина требуют более тщательного изучения механизмов его действия с целью прогнозирования его эффективности в разных условиях иммунотерапии. В данной работе исследовано влияние рекомбинантного GM-CSF человека на метаболическую активность клеток перитонеального экссудата мышей в первичной культуре клеток. Метаболическую (окислительно-восстановительную) активность клеток оценивали по способности восстанавливать нитросиний тетразолиевый (НСТ) в процессе MF- и Fc-зависимого фагоцитоза, вызванного внесением в среду опсонизированного зимозана либо эритроцитов барана. Продемонстрировано дозозависимое стимулирующее действие препарата GM-CSF на окислительный обмен фагоцитирующих перитонеальных макрофагов и нейтрофилов. Показано, что при 2- и 24-часовом культивировании пептон-элиситированных клеток с GM-CSF в широком диапазоне концентраций (от 5 до 40 000 нг/мл) более выраженный эффект препарата наблюдался в отношении нейтрофилов. Препарат GM-CSF вызывал достоверное увеличение (на 13-17%) окислительно-восстановительной активности нейтрофилов, индуцированной опсонизированным зимозаном, которое сохранялось в диапазоне низких доз и через 24 часа. Стимулирующий эффект GM-CSF на макрофаги (увеличение показателя НСТ на 16%) был отмечен только при

Адрес для переписки:

Сысоева Галина Михайловна
Институт медицинской биотехнологии ФБУН
«Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора
633010, Россия, г. Бердск, ул. Химзаводская, 9.
Тел.: 8 (383) 363-80-24 (доп. 53-35).
Факс: 8 (383) 363-80-16.
E-mail: sysoeva_gm@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Galina M. Sysoeva
Institute of Medical Biotechnology, State Research Center
of Virology and Biotechnology “Vector”
9 Khimzavodskaya St
Berdsk
633010 Russian Federation
Phone: +7 (383) 363-80-24 (acc. 53-35).
Fax: +7 (383) 363-80-16.
E-mail: sysoeva_gm@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

Г.М. Сысоева, С.Г. Гамалей, Т.И. Есина,
Е.Д. Даниленко «Исследование иммуномодулирующих
свойств рекомбинантного гранулоцитарно-
макрофагального колониестимулирующего фактора
человека» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25,
№ 2. С. 395-402. doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2550

© Сысоева Г.М. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.M. Sysoeva, S.G. Gamaley, T.I. Esina, E.D. Danilenko
“Immunomodulatory properties of recombinant human
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023,
Vol. 25, no. 2, pp. 395-402.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2550

© Sysoeva G.M. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2550

кратковременном культивировании. Общей тенденцией, отмеченной на элиситированных клетках обоого типа, являлась выраженная реакция на низкие концентрации препарата (5-125 нг/мл) и ослабление эффекта при их повышении. Аналогичная закономерность была обнаружена при исследовании резидентных макрофагов. Культивирование в течение 24 часов резидентных клеток с препаратом GM-CSF в дозах от 5000 до 40 000 нг/мл вызывало достоверное повышение окислительно-восстановительной активности клеток, индуцированной зимозаном либо эритроцитами барана (на 33-52%). Как в том, так и другом случае максимальная реакция была обнаружена в ответ на дозу 5000 нг/мл и снижалась по мере ее увеличения. Эффект стимуляции препарата GM-CSF в отношении резидентных макрофагов был более выраженным, чем элиситированных клеток, что проявлялось в удлинении периода их активации до суток от начала культивирования. Полученные данные представляют интерес с точки зрения перспектив использования препаратов GM-CSF в составе иммуномодулирующей и адьювантной терапии различных инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, макрофаги, нейтрофилы, метаболическая активность, зимозан, мыши

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR

Sysoeva G.M., Gamaley S.G., Esina T.I., Danilenko E.D.

Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Russian Federation

Abstract. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a myelopoietic growth factor that exerts pleiotropic effect not only on the differentiation of immature progenitor cells into polymorphonuclear neutrophils, monocytes/macrophages and dendritic cells, but also controls the functioning of differentiated cells. GM-CSF is currently being investigated in clinical trials as an immunomodulator and adjuvant. However, a wide range of biological activities and, sometimes, paradoxical effects of this cytokine require more thorough studies of its action, in order to predict its efficacy under different conditions of immunotherapy. In this work, we have studied the effect of recombinant human GM-CSF on metabolic activity of mouse peritoneal exudate cells in primary cell cultures. Metabolic (redox) activity of the cells was assessed by their ability to reduce nitroblue tetrazolium (NBT) in the course of MF- and Fc-dependent phagocytosis triggered by addition of opsonized zymosan, or sheep erythrocytes to the culture medium. We have shown the dose-dependent stimulatory effect of GM-CSF on the oxidative metabolism of phagocytic peritoneal macrophages and neutrophils. Upon culturing the pepton-elicited cells at wide range of GM-CSF concentrations (5 to 40,000 ng/mL) for 2 and 24 hours, a more pronounced effect of the substance was observed for neutrophils. The GM-CSF preparation caused a significant increase (by 13-17%) in the redox activity of neutrophils induced by opsonized zymosan that persisted at a low dose range, and was retained after 24 hours. The stimulatory effect of GM-CSF on macrophages with NBT index increase by 16% was observed in the short-term cultures. In general, the elicited cells of both types showed a more pronounced response to lower concentrations of GM-CSF (5-125 ng/mL), and weaker effect at higher doses of the preparation. A similar dependence was found when studying the resident macrophages. Culturing of resident cells with GM-CSF at the doses of 5,000 to 40,000 ng/mL for 24 hours caused a significantly increased redox activity of the cells induced by zymosan, or sheep erythrocytes (by 33-52%). In both cases, the maximal response was detected at a dose of 5,000 ng/mL and decreased with increasing dose. The stimulatory effect of GM-CSF upon resident macrophages was more pronounced as compared to elicited cells, which was characterized by the prolonged period of cell activation (up to 24 hours of culture). The data obtained are of interest, in view of prospective usage of GM-CSF as a component of immunomodulatory and adjuvant therapy for various infectious diseases.

Keywords: granulocyte-macrophage colony stimulating factor, macrophages, neutrophils, metabolic activity, zymosan, mice

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания, тема ГЗ-39/21.

Введение

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) представляет собой миелопоэтический фактор роста, который оказывает плеiotропное действие не только на дифференцировку незрелых предшественников в полиморфноядерные нейтрофилы, моноциты/макрофаги и дендритные клетки, но и контролирует функционирование дифференцированных иммунных клеток [3, 16]. Широкий спектр действия GM-CSF может приводить в ходе развития инфекционного или воспалительного процесса, злокачественных новообразований к парадоксальным результатам – как иммуностимуляции, так и иммуносупрессии [3]. Многообразные механизмы, лежащие в основе этих разнонаправленных эффектов, до конца не ясны. Однако уже сейчас известны некоторые аспекты его действия, которые могут быть причиной данного разнообразия. Прежде всего, GM-CSF в силу своей основной функции колониестимулирующего фактора оказывает влияние на дифференцировку и созревание большинства миелоидных клеток из клеток-предшественников. Помимо этого, данный цитокин реализует свое действие посредством нескольких типов сигнальных путей (JAK/STAT, PI3K, MAPK и NF-κB), управляющих различными биологическими процессами. И наконец, GM-CSF может продуцироваться разными типами клеток в ответ на различные сигналы окружающей среды [16].

Данные, полученные в ходе изучения биологических эффектов GM-CSF, послужили толчком к началу многочисленных клинических испытаний, таких, например, как вакциноадьювантная терапия для стимуляции противоопухолевого ответа, а в последнее время – и для предотвращения инфекций [4, 7, 8, 9]. Однако очевидно, что с целью прогнозирования эффективности GM-CSF в различных условиях иммунотерапии должны быть самым внимательным образом исследованы механизмы его действия.

Известно, что GM-CSF усиливает окислительный метаболизм, цитотоксичность и хемотаксис гранулоцитов [3]. Эффекты GM-CSF на функцию макрофагов менее ясны и однозначны. Известно, что данный фактор является одним из основных регуляторов дифференцировки моноцитов в тканевые макрофаги. Пул резидентных макрофагов пополняется за счет дифференцировки циркулирующих моноцитов при их попадании в ткани из кровотока.

Резидентные макрофаги обнаруживаются практически во всех тканях, где они могут составлять

до 10-15% от общего числа клеток. Макрофаги различной тканевой локализации обозначаются как остеокласты (кости), микроглиальные клетки (ЦНС), гистиоциты (соединительная ткань), клетки Купфера (печень), альвеолярные макрофаги (легкие) и фагоциты серозных полостей (в частности, перитонеальные) и т.д. Поскольку эти популяции характеризуются специфическими транскрипционными профилями, их можно рассматривать как множество разных и уникальных классов [11]. С другой стороны, основные функции макрофагов универсальны. Они играют ключевую роль в развитии тканей в иммунном ответе на патогены, в контроле и мониторинге возможных нарушений в тканях, в поддержании тканевого гомеостаза [3].

Целью данного исследования являлось изучение иммуномодулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека на первичной культуре клеток перитонеального экссудата мыши, а именно влияния препарата на окислительный обмен в процессе фагоцитоза перитонеальных макрофагов и нейтрофилов.

Материалы и методы

В экспериментах использовали препарат рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF), полученный в Институте медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по технологии, описанной в [1, 2]. Концентрация белка в препарате составляла 3,19 мг/мл, чистота и гомогенность превышали 97%, примеси белков и ДНК штамма-продукта укладывались в заданные нормативной документацией пределы (менее 200 нг/мг белка и 100 пг/мг ДНК соответственно). Содержание бактериальных эндотоксинов (3,5 ЕЭ/дозу) не превышало значения предельной пороговой дозы, рассчитанной с учетом максимальной терапевтической дозы 10 мкг/кг/час [Государственная фармакопея РФ XIV изд. [Электронное издание]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea>]. Препарат GM-CSF, полученный по разработанной технологии, обладал гемостимулирующей активностью, подтвержденной в системах *in vitro* и *in vivo* [6].

В качестве дополнительного контроля в ходе исследования использовали препарат эндотоксина *E. coli* UKT-B (FUJIFILM Wako Chemicals USA Corporation, серия G-85USA) с концентрацией 500 нг/флакон и биологической активностью 4300 ЕЭ/флакон.

Исследования проведены на 80 самках мышей линии BALB/c массой 20-23 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р. п. Кольцово Новосибирской обл.). До

начала эксперимента животные прошли период адаптационного карантина. Мыши содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе со свободным доступом к корму и воде. Работа выполнена согласно основным регулирующим стандартам в области надлежащей лабораторной практики с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1996).

Элиситированные перитонеальные нейтрофилы и макрофаги получали введением в брюшную полость мыши раствора 10%-го стерильного пептона. Через 3 ч животных умерщвляли декапитацией, из брюшной полости с помощью среды RPMI-1640 (5 мл, 4 °С) вымывали нейтрофилы. Перитонеальные макрофаги выделяли аналогичным образом через 96 ч после введения пептона и этаназии. Резидентные макрофаги получали вымыванием 5 мл среды RPMI-1640 без предварительного введения в брюшную полость пептона.

На основе перитонеального экссудата готовили клеточную взвесь в концентрации 10^6 клеток/мл. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе (10% CO_2 , 37 °С) в 96-луночных планшетах (Costar®, США) в среде RPMI-1640 с L-глутамином (ООО «БиолоТ», Россия), содержащей пенициллин, стрептомицин (по 100 ед/мл) и инактивированную фетальную сыворотку коров (10%, ООО «БиолоТ», Россия) (полная культуральная среда). В лунки планшета вносили по 100 мкл/лунку взвеси клеток перитонеального экссудата в полной среде RPMI-1640, 50 мкл препарата GM-CSF различной исходной концентрации (опыт), или 50 мкл стандарта эндотоксина в концентрации, равной его содержанию в препарате GM-CSF, или 50 мкл полной среды RPMI-1640 (контроль). Планшет помещали в CO_2 -инкубатор (37 °С, 5% CO_2) на 2 или 24 часа.

По завершении инкубации определяли функциональную активность клеток спектрофотометрическим методом с использованием красителя нитросинего тетразолиевого [5]. Для этого монослой клеток дважды отмывали раствором Хенкса и в каждую лунку добавляли 50 мкл полной среды RPMI, 100 мкл раствора нитросинего тетразолиевого с концентрацией 1 мкг/мл и 50 мкл опсонизированного зимозана (Sigma, 3 мг/мл) или опсонизированных эритроцитов барана (1% суспензия). После инкубации в течение часа частицы непоглощенного зимозана отмывали раствором Хенкса, фиксировали клеточный монослой 10%-ным раствором формалина, промывали дистиллированной водой, сушили и добавляли в каждую лунку 60 мкл раствора 2М гидроксида ка-

лия и 70 мкл диметилсульфоксида. Уровень окислительно-восстановительной активности клеток оценивали по изменению оптической плотности раствора, которую измеряли при длине волны 620 нм на многоканальном спектрофотометре для планшетов Multiskan EX (Thermo, Финляндия). Показатели выражали в оптических единицах (о. е.) $\times 100$.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics v. 5.0 (Statistical Graphics Corp., USA). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – среднюю арифметическую и ошибку средней. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали непараметрические критерии – Н-критерий множественных сравнений Краскела–Уоллиса и U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Принимая во внимание, что макрофаги и нейтрофилы являются профессиональными фагоцитами, активность которых модулируется как провоспалительными, так и противовоспалительными цитокинами [16], нами было проведено исследование влияния препарата GM-CSF на активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов в процессе MF- или Fc-зависимого фагоцитоза.

Показано, что двухчасовое культивирование элиситированных нейтрофилов с препаратом GM-CSF в дозах 5 и 125 нг/мл приводило к достоверному увеличению (на 16%) метаболической (окислительно-восстановительной) активности клеток, индуцированной опсонизированным зимозаном (табл. 1). Повышенная активность нейтрофилов сохранялась на этом уровне и в случае использования более высоких доз GM-CSF (от 2500 до 40000 нг/мл), однако дальнейшего увеличения значений показателя при увеличении дозы не обнаружено.

Повышение метаболической активности клеток наблюдали и при более длительном культивировании нейтрофилов с препаратом в диапазоне низких концентраций (от 5 до 125 нг/мл).

Стимулирующий эффект GM-CSF был отмечен также в отношении макрофагов. Увеличение уровня НСТ, восстановленного фагоцитирующими клетками, после 2 часов культивирования с препаратом в дозах 5 и 25 нг/мл составляло, соответственно, 142 и 122% по отношению к контрольному уровню. Тенденция к повышению показателя при увеличении его концентрации сохранялась и в диапазоне более высоких доз препарата (табл. 1). Удлинение периода культиви-

ТАБЛИЦА 1. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ И НЕЙТРОФИЛОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c ПОСЛЕ 2- И 24-ЧАСОВОЙ ИНКУБАЦИИ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ GM-CSF

TABLE 1. METABOLIC ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES AND NEUTROPHILS OF BALB/c MICE AFTER 2- AND 24-HOUR INCUBATION WITH rhGM-CSF

Препарат, доза Preparation, dose	Уровень восстановленного НСТ, о. е. × 100 Level of reduced NBT, a. u. × 100			
	2 часа 2 hours		24 часа 24 hours	
	Макрофаги Macrophages	Нейтрофилы Neutrophils	Макрофаги Macrophages	Нейтрофилы Neutrophils
Контроль (среда RPMI-1640) Control (RPMI-1640 medium)	15,2±0,7	24,3±0,5	16,2±0,5	19,0±0,7
GM-CSF, 5 нг/мл GM-CSF, 5 ng/mL	21,6±0,7*	28,0±1,0*	17,3±0,3	23,1±0,5*
GM-CSF, 25 нг/мл GM-CSF, 25 ng/mL	18,5±0,7*	26,3±0,7	17,4±0,5	22,8±0,7*
GM-CSF, 125 нг/мл GM-CSF, 125 ng/mL	17,7±0,4	28,2±0,6*	16,6±0,6	22,4±2,1*
GM-CSF, 500 нг/мл GM-CSF, 500 ng/mL	16,9±0,6	25,3±1,1	17,1±0,3	18,7±1,0
GM-CSF, 2500 нг/мл GM-CSF, 2,500 ng/mL	16,5±0,6	27,9±0,7*	16,4±0,5	18,4±1,1
GM-CSF, 10 000 нг/мл GM-CSF, 10,000 ng/mL	18,8±0,4*	27,4±0,9*	16,2±0,3	18,9±0,9
GM-CSF, 40 000 нг/мл GM-CSF, 40,000 ng/mL	НИ NS	28,4±1,6*	НИ NS	17,9±0,5

Примечание. Экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки (M±m); * – различия с контролем (среда RPMI-1640) статистически значимы, p ≤ 0,05; НИ – не исследовали.

Note. Experimental data are presented as the arithmetic mean and standard error (M±m); *, differences with the control (RPMI-1640 medium) are statistically significant, p ≤ 0.05; NS, not studied.

рования макрофагов с GM-CSF до 24 часов приводило к исчезновению эффекта стимуляции.

Поскольку активация препаратом GM-CSF фагоцитоза элиситированных макрофагов могла иметь свои особенности, аналогичное исследование было проведено на резидентных клетках. Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что культивирование резидентных макрофагов перитонеального экссудата в течение 24 часов с препаратом в дозах от 5000 до 40 000 нг/мл вызывало достоверное повышение окислительно-восстановительной активности клеток, индуцированной опсонизированным зимозаном либо эритроцитами барана (соответственно, MF- и Fc-зависимый фагоцитоз). Как в том, так и другом случае максимальная реакция была обнаружена в ответ на дозу 5 000 нг/мл и снижалась по мере ее увеличения.

Культивирование резидентных макрофагов с эндотоксином в концентрациях, эквивалентных его содержанию в соответствующих дозах препарата GM-CSF (от 0,09 до 1,48 нг/мл), не приводило к повышению метаболической активности

клеток, индуцированной опсонизированным зимозаном (данные не приведены). Это позволяет заключить, что эффект стимуляции не связан с наличием в препарате посторонних иммуномодулирующих примесей.

Сравнение модулирующей активности препарата GM-CSF на резидентные и элиситированные макрофаги показывает, что эффект стимуляции в отношении резидентных клеток был более выраженным, что проявлялось в удлинении периода их активации до суток от начала культивирования.

Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат рекомбинантного GM-CSF человека обладал способностью изменять окислительно-восстановительную активность клеток перитонеального экссудата (макрофаги, нейтрофилы) мышей, что проявлялось в повышении их способности метаболизировать НСТ. Эффект препарата зависел от типа клеток, их исходного состояния, дозы и длительности культивирования.

Стимулирующий эффект GM-CSF, сравнимый по интенсивности, был более пролонгиро-

ТАБЛИЦА 2. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЕЗИДЕНТНЫХ МАКРОФАГОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЭКССУДАТА МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c ПОСЛЕ 24-ЧАСОВОЙ ИНКУБАЦИИ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ GM-CSF

TABLE 2. METABOLIC ACTIVITY OF RESIDENT MACROPHAGES IN THE PERITONEAL EXUDATE OF BALB/c MICE AFTER 24-HOUR INCUBATION WITH rhGM-CSF

Препарат, доза Preparation, dose	Уровень восстановленного НСТ, о. е. × 100 Level of reduced NBT, a. u. × 100	
	Опсонизированный зимозан Opsonized zymosan	Опсонизированные эритроциты барана Opsonized sheep erythrocytes
Контроль (среда RPMI-1640) Control (RPMI-1640 medium)	14,8±0,2	11,2±0,4
GM-CSF, 2500 нг/мл GM-CSF, 2,500 ng/mL	16,4±0,6	9,3±0,7
GM-CSF, 5000 нг/мл GM-CSF, 5,000 ng/mL	19,7±0,6*	17,0±1,0*
GM-CSF, 10 000 нг/мл GM-CSF, 10,000 ng/mL	19,0±1,0*	14,4±1,7*
GM-CSF, 20 000 нг/мл GM-CSF, 20,000 ng/mL	18,1±0,9*	13,9±1,3*
GM-CSF, 40 000 нг/мл GM-CSF, 40,000 ng/mL	17,8±0,6*	13,1±1,4

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ванным в отношении фагоцитирующих пептон-элиситированных нейтрофилов по сравнению с макрофагами. Препарат GM-CSF вызывал достоверное увеличение (на 13-17%) окислительно-восстановительной активности нейтрофилов, индуцированной опсонизированным зимозаном, которое сохранялось в диапазоне низких доз и через 24 часа. Стимулирующий эффект GM-CSF на макрофаги был отмечен только при кратковременном культивировании.

Общей тенденцией, отмеченной на клетках обоого типа, являлась более выраженная реакция на низкие концентрации препарата и ослабление эффекта при их повышении. Аналогичная закономерность, как видно из представленных выше данных, наблюдалась и на резидентных макрофагах. Надо сказать, стимулирующий эффект GM-CSF в отношении фагоцитов с аналогичной дозовой зависимостью описан и другими исследователями. Так, авторами работы [10] показано, что рекомбинантный мышинный GM-CSF повышал окислительный метаболизм и фагоцитарную активность резидентных и элиситированных тиюгликолятом макрофагов мыши. Как в том, так и другом случае препарат усиливал зимозан-индуцированный фагоцитоз и продукцию клетками H₂O₂ в дозе 5 МЕ/мл, при этом эффект стимуляции исчезал при увеличении дозы.

Различия в реакции на объект фагоцитоза (β-глюкан, зимозан) резидентных и элиситированных перитонеальных макрофагов, на

наш взгляд, может быть связано с различиями в рецепторных характеристиках этих клеток. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, приведенные в работе [15], где был исследован уровень экспрессии макрофагами и связывания с лигандами рецептора β-гликанов дектина-1. Авторы работы показали, что 24-часовое культивирование перитонеальных макрофагов с GM-CSF значительно повышало экспрессию дектина-1 и, как следствие, связывание клетками зимозана. При этом были обнаружены количественные различия между показателями резидентных и элиситированных тиюгликолятом макрофагов: величина ответа элиситированных клеток была ниже резидентных. Результатом более высокого уровня экспрессии рецепторов и связывания зимозана, по-видимому, может быть более высокий уровень окислительного метаболизма резидентных макрофагов, что и наблюдалось в наших экспериментах.

Полученные нами результаты хорошо коррелируют с данными о повышении под действием GM-CSF способности нейтрофилов и макрофагов к фагоцитированию и уничтожению грибковых и бактериальных патогенов [7]. Так, авторами работы [8] отмечено ингибирование размножения *Mycobacterium avium* в макрофагах человека, обработанных препаратом рекомбинантного человеческого GM-CSF сарграмостимом. Аналогичный эффект наблюдали на мышах, инфицированных *Mycobacterium avium*. Было показано, что введение

сарграмостима в течение 14 дней после заражения приводило к резкому снижению числа бактерий в печени и селезенке опытных животных по сравнению с контрольными мышами.

Препарат рекомбинантного GM-CSF обладал способностью ингибировать супрессивный эффект дексаметазона в культуре перитонеальных и бронхоальвеолярных макрофагов мышей и повышал их ингибирующую активность в отношении *Aspergillus fumigatus* [9]. Интересно то, что конидиацидную активность на культурах тканевых макрофагов мышей проявляли в равной степени как мышинный, так и человеческий GM-CSF.

Данные об отсутствии различий в эффектах GM-CSF разного происхождения заставляют несколько иначе взглянуть на вопрос о видовой специфичности этого цитокина. С одной стороны, существуют многочисленные данные относительно неспособности человеческого GM-CSF специфически связываться с мышинными рецепторами и взаимодействовать с гемопоэтически ми предшественниками и клетками крови мышей [13, 14]. С другой стороны, в работе [12] было показано, что рекомбинантный GM-CSF человека способен усиливать пролиферацию мышинных гемопоэтических клеток-предшественников при совместном культивировании с мышинным IL-3. Кроме того, человеческий GM-CSF без каких-либо дополнительных экзогенных модуляторов индуцировал дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников в костном мозге мышей, подвергнутых сублетальному облуче-

нию, при этом эффект цитокина не отличался по интенсивности от эффекта мышинного GM-CSF. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что человеческий GM-CSF способен воздействовать на клетки мышей, но непрямым способом.

Выводы

1. Рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный фактор человека обладает способностью дозозависимо усиливать окислительный метаболизм тканевых дифференцированных клеток иммунной системы – нейтрофилов и макрофагов перитонеального экссудата в культуре клеток.

2. Эффект стимуляции препарата GM-CSF, сравнимый по интенсивности, был более пролонгированным в отношении элиситированных нейтрофилов по сравнению с макрофагами.

3. Интенсивность и продолжительность стимулирующего эффекта GM-CSF на макрофаги зависели от функционального состояния клеточной популяции. Эффект препарата в отношении резидентных клеток был более выраженным по сравнению с элиситированными, что проявлялось в удлинении периода их активации.

Полученные данные представляют интерес с точки зрения перспектив использования препаратов GM-CSF в составе иммуномодулирующей и адьювантной терапии различных инфекционных заболеваний.

Список литературы / References

1. Гилева И.П., Есина Т.И., Волосникова Е.А., Гогина Я.С., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. Рекомбинантная плазмидная ДНК p280_2GM, кодирующая полипептид со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, штамм E. COLI SG 20050/p280_2GM – продуцент полипептида со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и способ получения указанного полипептида. Патент Российской Федерации № 2708556; 2019. [Gileva I.P., Esina T.I., Volosnikova E.A., Gogina Ya.S., Lebedev L.R., Danilenko E.D. Recombinant plasmid DNA p280_2GM coding polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human, strain Escherichia coli SG 20050/p280_2GM – producer of polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human and method of obtaining of said polypeptide. Patent RF. No. 2708556; 2019.]
2. Есина Т.И., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А., Гилева И.П., Гогина Я.С., Терещенко Т.А., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Даниленко Е.Д. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // Биотехнология, 2019. Т. 35, № 3. С. 68-73. [Esina T.I., Lebedev L.R., Volosnikova E.A., Gileva I.P., Gogina Ya.S., Tereshchenko T.A., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Danilenko E.D. Method for obtaining recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biotekhnologiya = Biotechnology*, 2019, Vol. 35, no. 3, pp. 68-73. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1031-1054. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Immunobiological properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides of his active center. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1031-1054. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216.
4. Сысова Г.М., Белкина А.О., Даниленко Е.Д. Перспективы использования гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора в качестве иммуоадьюванта при вакцинопрофилактике // Биофармацевтический журнал, 2019. Т. 11, № 4. С. 3-14. [Sysoeva G.M., Belkina A.O., Danilenko E.D. Prospects

for the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an immunoadjuvant in vaccine prevention. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*, 2019, Vol. 11, no. 4, pp. 3-14. (In Russ.)]

5. Чесноков В.А., Воскресенский А.М., Свиридов Л.П. Оценка функциональной активности перитонеальных макрофагов с помощью тетразолиевого теста // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1985. № 5. С. 89-90. [Chesnokov V.A., Voskresensky A.M., Sviridov L.P. Evaluation of the functional activity of peritoneal macrophages using the tetrazolium test. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1985, no. 5, pp. 89-90. (In Russ.)]

6. Шими́на Г.Г., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Есина Т.И., Терещенко Т.Г., Даниленко Е.Д. Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2020. Т. 20, № 4. С. 268-276. [Shimina G.G., Bateneva A.V., Gamalei S.G., Esina T.I., Tereshchenko T.G., Danilenko E.D. Study on hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2020, Vol. 20, no. 4, pp. 268-276. (In Russ.)]

7. Armitage J.O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1998, Vol. 92, no. 12, pp. 4491-4508.

8. Bermudez L.E., Martinelli J., Petrofsky M., Kolonoski P., Lowell S., Young L.S. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the effects of antibiotics against mycobacterium avium complex infection in the beige mouse model. *J. Infect. Dis.*, 1994, Vol. 169, no. 3, pp. 575-580.

9. Brummer E., Maqbool A., Stevens D.A. Protection of peritoneal macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) against dexamethasone suppression of killing of *Aspergillus*, and the effect of human GM-CSF. *Microbes Infect.*, 2002, Vol. 4, no. 2, pp. 133-138.

10. Coleman D.L., Chodakewitz J.A., Bartiss A.H., Mellors J.W. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances selective effector functions of tissue-derived macrophages. *Blood*, 1988, Vol. 72, no. 2, pp. 573-578.

11. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, pp. 953-964.

12. Hofer M., Vacek A., Weiterova L. Action of granulopoiesis-stimulating cytokines rhG-CSF, rhGM-CSF, and rmGM-CSF on murine hematopoietic progenitor cells for granulocytes and macrophages (GM-CFC). *Physiol. Res.*, 2005, Vol. 54, pp. 207-213.

13. Park L.S., Friend D., Gillis S., Urdal D.L. Characterization of the cell surface receptor for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 1986, Vol. 164, no. 1, pp. 251-262.

14. Schuh J.C., Morrissey P.J. Development of a recombinant growth factor and fusion protein: lessons from GM-CSF. *Toxicol. Pathol.*, 1999, Vol. 27, no. 1, pp. 72-77.

15. Willment J.A., Lin H.-H., Reid D.M., Taylor P.R. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-Treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 9, pp. 4569-4573.

16. Zhan Y., Lew A.M., Chopin M. The pleiotropic effects of the GM-CSF rheostat on myeloid cell differentiation and function: more than a numbers game. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2679. doi: 10.3389/fimmu.2019.02679.

Авторы:

Сысоева Г.М. — ведущий научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

Гамалей С.Г. — заведующая отделом биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

Есина Т.И. — младший научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

Даниленко Е.Д. — к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

Authors:

Sysoeva G.M., Leading Research Associate, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

Gamaley S.G., Head, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

Esina T.I., Junior Research Associate, Department of Technology Development and Pilot Production of Biological Preparations, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

Danilenko E.D., PhD (Biology), Director, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

Поступила 12.07.2022

Отправлена на доработку 20.08.2022

Принята к печати 08.11.2022

Received 12.07.2022

Revision received 20.08.2022

Accepted 08.11.2022