

Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека

Г. Г. Шими́на*, А. В. Батенева, С. Г. Гамалей, Т. И. Есина, Т. Г. Терещенко, Е. Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
ул. Химзаводская, д. 9, Бердск, Новосибирская область, 633010, Российская Федерация

Гемостимулирующие свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) позволяют использовать его в клинике для снижения побочных эффектов радио- и химиотерапии онкологических заболеваний, при трансплантации костного мозга, для лечения некоторых первичных иммунодефицитных состояний, связанных с лейкопенией. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана высокопроизводительная технология получения рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рчГМ-КСФ) на основе рекомбинантного штамма *E. coli*. **Цель работы:** изучение гемостимулирующей активности препарата рекомбинантного ГМ-КСФ человека, полученного по разработанной технологии, в культуре клеток и на модели миелосупрессии у мышей, вызванной введением циклофосфана. **Материалы и методы:** оценку гемостимулирующей активности рчГМ-КСФ *in vitro* проводили с использованием МТТ-теста на коммерческой культуре клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60, скорость роста которых предварительно подавляли добавлением в среду низкой концентрации диметилсульфоксида. Исследования *in vivo* проводили на мышах линии CBA/Calac в условиях миелосупрессии, вызванной введением циклофосфана. Гемостимулирующие свойства препарата оценивали при его подкожном введении в диапазоне доз от 1 до 175 мкг/кг в течение 4–5 суток после введения цитостатика. В образцах крови, взятых в разные сроки после введения, определяли общее количество лейкоцитов и содержание их морфологических форм. Данные эксперимента обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ Statgraphics, v. 5.0. **Результаты:** пролиферативная активность клеток HL-60, инкубированных с препаратом рчГМ-КСФ в течение 72 ч, носила дозозависимый характер. Наиболее высокие значения повышения пролиферативной активности при увеличении дозы препарата наблюдались в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,64 нг/мл (прирост значений показателя при двукратном увеличении дозы составлял 11–18%). В экспериментах на мышах продемонстрирован двухфазный характер дозовой зависимости эффекта. Наибольшую гемостимулирующую активность препарат проявлял в дозе 90 мкг/кг. **Выводы:** препарат рчГМ-КСФ, полученный по разработанной технологии, обладает выраженной гемостимулирующей активностью, подтвержденной в системах *in vitro* и *in vivo*. **Ключевые слова:** рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (рчГМ-КСФ); гемостимулирующая активность; миелосупрессия; циклофосфан; мыши линии CBA/Calac; культура клеток HL-60

Для цитирования: Шими́на ГГ, Батенева АВ, Гамалей СГ, Есина ТИ, Терещенко ТГ, Даниленко ЕД. Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):268–276. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276>

* **Контактное лицо:** Шими́на Галина Григорьевна; shimina_gg@vector.nsc.ru

Study on Hemostimulating Properties of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

G. G. Shimina*, A. V. Bateneva, S. G. Gamaley, T. I. Esina, T. G. Tereshchenko, E. D. Danilenko

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”
of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing,
9 Khimzavodskaya St., Berdsk, Novosibirsk oblast 633010, Russian Federation

The hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) make possible its clinical use in alleviating side effects of anti-cancer radio- and chemotherapy, in bone marrow transplantation, and in the treatment of some primary immunodeficiency conditions associated with leukopenia. The State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing has developed a high-performance technology for production of recombinant human GM-CSF (rhGM-CSF) based on a recombinant *E. coli* strain. **The aim of the study** was to assess hemostimulating activity of the rhGM-CSF preparation obtained using the new developed technology, as observed in cell culture and in the mice model of myelosuppression induced by cyclophosphamide administration. **Materials and methods:** *in vitro* evaluation of rhGM-CSF hemostimulating activity was performed by MTT assay in the commercial HL-60 promyelocytic leukemia cell culture with preliminary suppression of cell growth rate by adding a low concentration of dimethyl sulfoxide to the medium. *In vivo* studies were carried out in CBA/Calac mice with

cyclophosphamide-induced myelosuppression. The hemostimulating properties of the drug were evaluated after subcutaneous administration of 1–175 µg/kg doses for 4–5 days, following administration of a cytostatic agent. The total number of leukocytes and the content of their morphological forms were determined in blood samples taken at different time points after the drug administration. The statistical processing of the experimental data was based on analysis of variance using Statgraphics v. 5.0 software. **Results:** the proliferative activity of HL-60 cells incubated with the rhGM-CSF preparation for 72 hours was shown to be dose-dependent. The highest values of the increase in proliferative activity associated with an increase in the drug dose were observed in the concentration range from 0.04 to 0.64 ng/mL (proliferative activity increased by 11–18% when the dose was increased two-fold). The experiments in mice demonstrated a two-phase pattern of the dose-dependent effect. The drug showed the highest hemostimulating effect at the dose of 90 µg/kg. **Conclusions:** the rhGM-CSF preparation obtained using the new developed technology has a pronounced hemostimulating activity confirmed by both *in vitro* and *in vivo* test systems.

Key words: recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF); hemostimulating activity; myelosuppression; cyclophosphamide; CBA/CaLac mice; HL-60 cell culture

For citation: Shimina GG, Bateneva AV, Gamaley SG, Esina TI, Tereshchenko TG, Danilenko ED. Study on hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):268–276. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276>

* **Corresponding author:** Galina G. Shimina; shimina_gg@vector.nsc.ru

Как известно, нейтрофилы играют важную роль в цепи защитных реакций организма. Нейтропеническая инфекция в силу ослабления иммунной защиты склонна к быстрому прогрессированию и без лечения может в короткие сроки привести к гибели больного [1]. Профилактика нейтропении и лечение уже развившейся нейтропении и нейтропенических осложнений — основные области применения лекарственных препаратов, активным компонентом которых являются колониестимулирующие факторы [1, 2].

Среди ростовых факторов, играющих ключевую роль в процессах гранулоцитопоэза, особое место принадлежит гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (ГМ-КСФ). ГМ-КСФ — природный белок-цитокин с плеiotропными биологическими свойствами. Гемопэтическая активность ГМ-КСФ заключается в мобилизации нейтрофилов и моноцитов из тканевых депо в системный кровоток, ускорении их пролиферации и созревания в костном мозге, а также в усилении функциональной активности фагоцитирующих клеток [2–4].

Способность ГМ-КСФ стимулировать пролиферацию и дифференцировку предшественников гранулоцитов и макрофагов сделала возможным его клиническое использование для снижения побочных эффектов радио- и химиотерапии злокачественных новообразований, мобилизации клеток-предшественников и улучшения приживления трансплантатов костного мозга, а также для лечения некоторых первичных иммунодефицитных состояний, связанных с лейкопенией [2, 5–7].

Исследования последних лет дают основания полагать, что область клинического применения данного цитокина может быть значительно расширена. Негематологические показания к применению препаратов ГМ-КСФ связаны с его альтернативными биологическими эффектами, включая иммуномодулирующие, противовоспалительные, противоопухолевые, трофические эффекты, способность стимулировать регенерацию и неоангиогенез. Это позволяет рассматривать возможность применения препарата при различных вторичных иммунодефицитах, травматических поражениях, ишемической патологии, дистрофических болезнях, репродуктивной дисфункции, аутоиммунных, аллергических и иммуновоспалительных синдромах, некоторых неоплазиях и инфекциях [2].

Одной из главных проблем в технологии получения рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рГМ-КСФ) как фармацевтической субстанции является низкая продуктивность рекомбинантных штаммов-продуцентов [8, 9]. Для решения этой проблемы в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была

сконструирована рекомбинантная плаزمидная р280_2GM, несущая тандем генов ГМ-КСФ человека, и штамм-продуцент на ее основе. Разработанный способ выделения и очистки рекомбинантного ГМ-КСФ из клеток штамма-продуцента обеспечивает получение до 10 мг высокоочищенного белка из 1 г влажных клеток, что в 1,5–2 раза выше, чем при использовании других бактериальных продуцентов [10].

Цель работы — изучение гемостимулирующей активности препарата рекомбинантного ГМ-КСФ человека, полученного по разработанной технологии, в культуре клеток и на модели миелосупрессии у мышей, вызванной введением циклофосфана.

Материалы и методы

В экспериментах использовали препарат рГМ-КСФ, полученный в Институте медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [10, 11]. Содержание белка в препарате рГМ-КСФ определяли по методу Брэдфорда [12]. Для определения чистоты, гомогенности и молекулярной массы рГМ-КСФ использовали метод вертикального гель-электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250 [13]. Содержание примесных белков штамма-продуцента оценивали иммуноферментным методом, содержание примесных ДНК — методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов *E. coli* HCP ELISA Kit и *E. coli* Host Cell DNA Extraction and Amplification Kit (Cygnus Technologies, США).

Оценку гемостимулирующей активности рГМ-КСФ *in vitro* проводили на коммерческой культуре клеток промиелоцитарной лейкемии человека HL-60 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), скорость роста которых предварительно подавляли добавлением в среду низкой концентрации диметилсульфоксида (ДМСО) [14].

Клетки HL-60 субкультивировали в ростовой среде RPMI-1640 с L-глутамином, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. В лунки 96-луночного культурального планшета (TPP, Швейцария) вносили по 100 мкл клеточной суспензии (1×10^4 клеток) в ростовой среде, содержащей 1,25% ДМСО, инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в атмосфере с 5% CO₂ в течение 48 ч, после чего вносили тестируемый препарат в объеме 25 мкл, который предварительно разводили в ростовой среде с 1,25% ДМСО до конечных концентраций в лунках от 0,005 до 5,12 нг/мл, с 2-кратным

шагом разведений. Каждое разведение ставили в 5 повторях. В контрольные лунки вносили по 25 мкл среды с ДМСО. Клетки культивировали (37 °С, 5% CO₂) в течение 72 ч. Оценку количества живых клеток проводили с помощью МТТ-теста [15]. Для этого в лунки вносили по 25 мкл раствора красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в концентрации 5 мг/мл, планшеты инкубировали при температуре 37 °С в течение 4 ч. После удаления среды в лунки вносили по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов образовавшегося формазана, встряхивали на шейкере при 600 об/мин в течение 5 мин. Оптическую плотность растворенного формазана измеряли на многоканальном планшетном спектрофотометре при длине волны 596 нм (референс-фильтр — 630 нм). На основании средних значений оптической плотности в контрольных лунках и лунках с исследуемым препаратом рассчитывали процент стимуляции роста клеток в исследованном диапазоне концентраций.

Метод изучения гемостимулирующей активности рЧГМ-КСФ на мышах и условия содержания животных были аналогичны описанному для нуклеопротеидного комплекса, выделенного из плаценты человека (Панаген) [16]. Исследования *in vivo* проведены на 132 самцах мышей линии СВА/Calac с массой тела 19–23 г (возраст 2,5–3,0 месяца), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область). 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. Условия содержания и ухода за животными соответствовали действующим нормативным документам¹. Работа выполнена согласно основным регулирующим стандартам в области надлежащей лабораторной практики² с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях³.

Манипуляции осуществляли в одно и то же время (в утренние часы). Для моделирования миелосупрессии мышам однократно вводили раствор циклофосфана (ЦФ) (Sigma-Aldrich, США) в максимально переносимой дозе (250 мг/кг) в объеме 0,25 мл на 20 г массы тела.

Было проведено две серии экспериментов. В первой серии исследовали динамику восстановления показателей крови под действием препарата рЧГМ-КСФ в стандартной дозе (100 мкг/кг), определенной ранее в предварительных экспериментах. С этой целью препарат вводили мышам опытных групп подкожно в объеме 0,2 мл на 20 г массы тела один раз в сутки в течение 4, 5 и 6 суток, первое введение — через 24 ч после инъекции ЦФ, забор крови на анализ — на 5, 6, 7 и 8-е сутки после введения ЦФ. Во второй серии экспериментов уточняли диапазон эффективных доз препарата при его введении в соответствии с выбранной схемой. Животные опытных групп получали инъекции препарата рЧГМ-КСФ в дозах от 1 до

175 мкг/кг. Во всех экспериментах мышам контрольных групп вводили подкожно физиологический раствор в эквивалентном объеме и по той же схеме, что и животным опытной группы. В каждой экспериментальной группе было по 6 мышей. После окончания курса введения препаратов у животных забирали на анализ образцы крови из кончика хвоста. В образцах крови определяли общее количество лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание нейтрофилов и других морфологических форм лейкоцитов [17].

Данные экспериментов обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ Statgraphics, v. 5.0 (Statistical Graphics Corp., США). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики — среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку ($M \pm m$). В связи с малыми объемами выборок для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрический *H*-критерий Краскала — Уоллиса. При обнаружении статистически значимых различий проводили сравнения с помощью двухвыборочного *U*-критерия Манна — Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (*p*) принимали равным 0,05 [18].

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования был проведен анализ чистоты образца рЧГМ-КСФ. Установлено, что концентрация белка в препарате составляла 1,17 мг/мл, гомогенность — 95,3%, молекулярная масса белковой фракции — 15,7 кДа. Содержало примесей ДНК клеток штамма-продуцента не превышало 8,55 пг/мг, примесных белков — 65,17 нг/мг. То есть препарат содержал высокоочищенный белок, соответствующий требованиям, предъявляемым к рекомбинантным белкам фармацевтического качества⁴.

Вторым этапом исследования являлась оценка гемостимулирующей активности рЧГМ-КСФ на клетках промиелоцитарной лейкемии HL-60. Показано, что препарат вызывал усиление роста культуры клеток в диапазоне доз 0,005–5,12 нг/мл (табл. 1). Динамика роста клеток носила дозозависимый характер. Наиболее высокие значения повышения пролиферативной активности при увеличении дозы наблюдались в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,64 нг/мл (прирост значений показателя при двукратном увеличении дозы составлял 11–18%). При использовании более высоких доз наблюдалось замедление процесса, что, возможно, связано с ограниченным количеством мест рецепторного связывания белка и достижением определенного предела насыщения. Концентрация рЧГМ-КСФ, вызывающая 50% увеличение количества клеток, составляла 0,043 нг/мл.

Метод определения биологической активности гемостимулирующих факторов с использованием клеточной линии HL-60 был предложен Т. Yamaguchi с соавт. [14]. В данной работе было продемонстрировано дозозависимое усиление клеточной пролиферации под влиянием рЧГМ-КСФ, полученного

¹ СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур (Переиздание).

ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание).

² Правила надлежащей лабораторной практики (утв. Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н).

ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики.

³ European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

⁴ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Таблица 1. Стимуляция роста клеток HL-60 в зависимости от концентрации рчГМ-КСФ через 72 ч инкубации
Table 1. Stimulation of HL-60 cell growth as a function of rhGM-CSF concentration after 72 hours of incubation

Концентрация рчГМ-КСФ, нг/мл Concentration of rhGM-CSF, ng/mL	Пролиферативная активность ($M \pm m$), % Proliferative activity ($M \pm m$), %
0,005	16,8 ± 1,1
0,01	22,2 ± 2,8
0,02	31,4 ± 1,9
0,04	48,6 ± 2,0
0,08	66,4 ± 1,2
0,16	75,4 ± 2,2
0,32	93,6 ± 4,5
0,64	111 ± 3
1,28	117 ± 5
2,56	115 ± 3
5,12	122 ± 2

Примечание. Пролиферативная активность выражена в процентах к контрольной группе — клеточная суспензия без добавления рчГМ-КСФ.
M ± m — средняя арифметическая величина и стандартная ошибка.
Note. Proliferative activity is expressed as a percentage as compared to the control group—a cell suspension with no addition of rhGM-CSF.
M ± m—the mean value and standard deviation.

в прокариотической системе (*E. coli*) в диапазоне концентраций 0,1–1,75 нг/мл, что согласуется с результатами нашего исследования.

В исследовании А. А. Гражданцевой с соавт. [19] биологическая активность рчГМ-КСФ, синтезируемого эукариотическими клетками ЛЭЧ-240 и ВНК-Ф, инфицированными рекомбинантным штаммом вируса осповакцины со встроенным геном ГМ-КСФ человека, была протестирована на клетках эритролейкоза человека TF-1. Авторы работы обнаружили зависимость от дозы стимуляцию пролиферации клеток TF-1 при добавлении культуральной среды клеток-продуцентов рчГМ-КСФ. Биологическая активность образцов зависела от типа клеток-продуцентов ГМ-КСФ. Так, концентрация белка, вызывающая двукратное увеличение количества клеток TF-1, для белка, продуцируемого клетками ЛЭЧ-240, составляла 1,2 мкг/мл, клетками ВНК-Ф — 40 мкг/мл, что в основном соответствует диапазону эффективных концентраций рчГМ-КСФ в наших экспериментах.

Таким образом, препарат рчГМ-КСФ, полученный по разработанной технологии, обладал способностью усиливать пролиферативную активность клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60, чувствительных к природному ГМ-КСФ.

Следующим этапом работы было изучение активности препарата рчГМ-КСФ *in vivo*. На рисунке 1 приведены экспериментальные данные, полученные в процессе цитостатической миелосупрессии, вызванной введением ЦФ мышам. Установлено, что введение цитостатика приводило к резкому снижению в крови животных общего числа лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Содержание лейкоцитов крови мышей контрольной и опытной групп на 5-е сутки после введения ЦФ было ниже интактных значений, соответственно, на 87 и 84%, нейтрофилов — на 92 и 88%. На 6-е сутки эксперимента в группе, которой вводили рчГМ-КСФ (100 мкг/кг), отмечено статистически значимое повышение значений показателей по сравнению с контролем: лейкоцитов — в 1,3 раза, сегментоядерных нейтрофилов — в 1,5 раза. На 7-е и 8-е сутки уровень показателей в обеих группах уже не отличался от интактного, поэтому дальнейшее исследование активности препарата проводилось на 5-е и 6-е сутки после введения ЦФ.

Животные опытных групп второй экспериментальной серии получали инъекции препарата рчГМ-КСФ в дозах от 1 до 175 мкг/кг четырехкратно, инъекции начинали через 1 сутки

после введения ЦФ, кровь на анализ забирали на 5-е и 6-е сутки после введения цитостатика.

Результаты, полученные в эксперименте по исследованию активности препарата в диапазоне доз 50–175 мкг/кг, представлены на рисунке 2. В группе мышей, которым вводили препарат рчГМ-КСФ в дозе 75 мкг/кг, отмечена отчетливая тенденция к ускорению восстановления морфологического состава периферической крови по сравнению с группой контрольной и группой животных, которым препарат вводили в дозе 50 мкг/кг. Через 1 сутки после окончания введения препарата (5-е сутки после введения ЦФ) количество лейкоцитов крови мышей, получавших препарат в дозе 75 мкг/кг, было в 1,3 раза выше, сегментоядерных нейтрофилов — в 1,25 раза выше контрольных показателей. Дальнейшее увеличение дозы до 125–175 мкг/кг приводило к торможению процесса. В крови животных этих групп отмечена тенденция к снижению содержания лейкоцитов и нейтрофилов по сравнению с контрольным уровнем, достоверная по содержанию нейтрофилов в группе мышей, которым препарат вводили в дозе 150 мкг/кг (рис. 2).

Как известно, двухфазная кривая «доза–эффект» является универсальным свойством биологических систем [20]. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что ГМ-КСФ может оказывать иммуностимулирующее действие в малых дозах и иммуносупрессивное — в высоких [21]. Оппозитные эффекты ГМ-КСФ в разных дозах на кроветворные клетки-предшественники описаны L. Sun с соавт. [22]. Авторами этой работы показано, что низкие дозы ГМ-КСФ способствовали увеличению числа клеток гранулоцитарной линии преимущественно путем повышения их выживаемости; увеличение дозы приводило к выходу на плато с последующим снижением показателя, аналогично тому, что наблюдалось в наших экспериментах.

Динамика изменения гематологических показателей под действием препарата рчГМ-КСФ в диапазоне низких доз была иной. Введение рчГМ-КСФ в дозах от 10 до 90 мкг/кг приводило к дозозависимому повышению на 6-е сутки эксперимента обоих исследованных показателей (рис. 3, 4). Более выраженной была реакция на препарат нейтрофилов: если число лейкоцитов крови в этот период составляло 62–67% от интактного уровня, то содержание нейтрофилов на 50–65% его превышало. Наиболее интенсивной гемостимулирующей активностью препарат обладал в дозе 90 мкг/кг. Число лейкоцитов

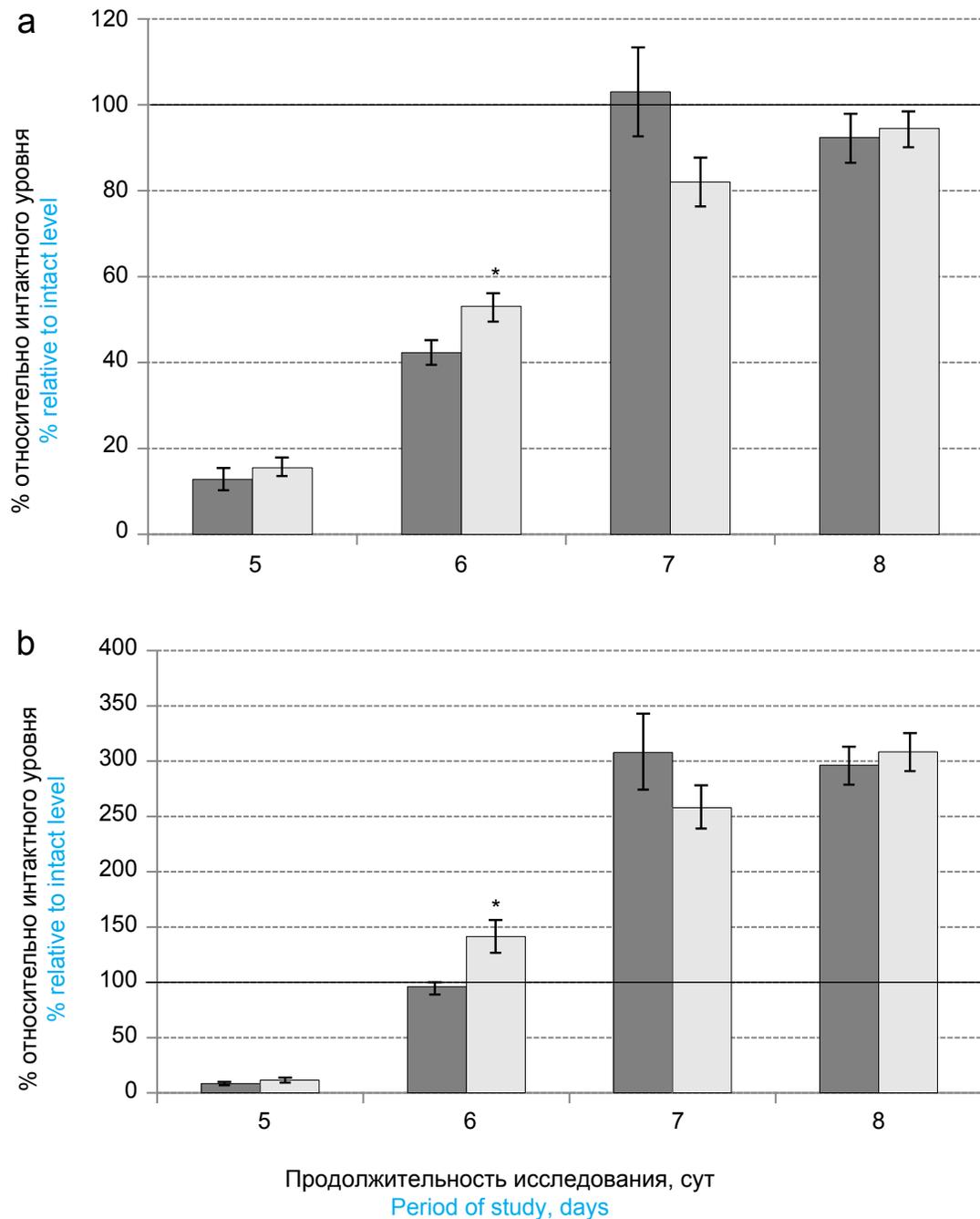


Рис. 1. Динамика изменения общего количества лейкоцитов (а) и сегментоядерных нейтрофилов (б) в периферической крови мышей СВА/Calac после введения им циклофосфана (темный столбик) или циклофосфана и рчГМ-КСФ (светлый столбик). Значения показателя приведены относительно значений показателя у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (циклофосфан + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 1. Changes in the total number of leukocytes (a) and segmentonuclear neutrophils (b) in the peripheral blood of CBA/Calac mice after administration of cyclophosphamide (dark bar) or cyclophosphamide and rhGM-CSF (light bar). The values are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

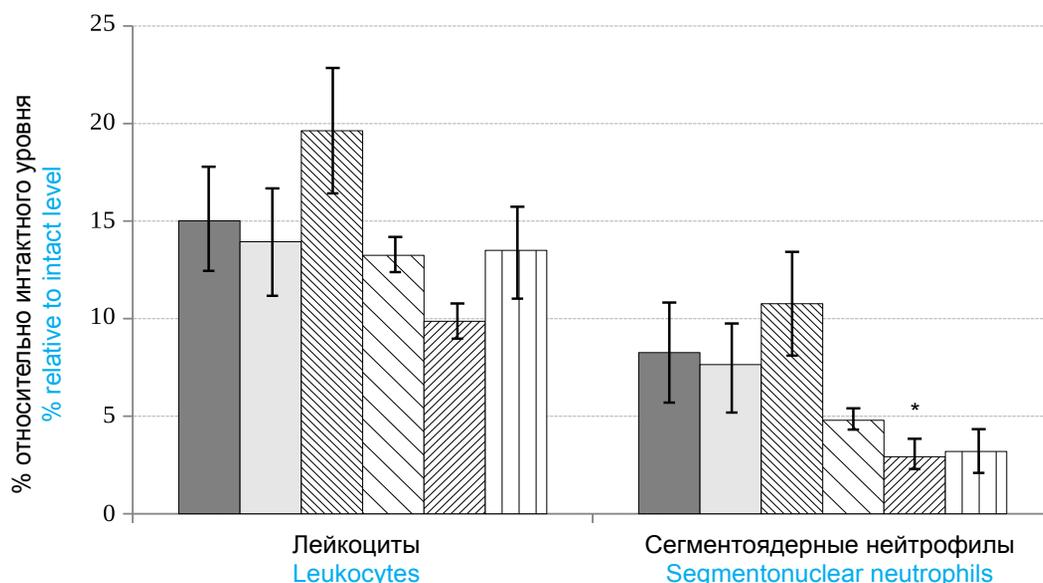


Рис. 2. Влияние препарата рчГМ-КСФ в дозах 50–175 мкг/кг на показатели периферической крови мышей СВА/Calac, подвергшихся воздействию циклофосфана. ■ циклофосфан + физиологический раствор; □ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 50 мкг/кг; ▨ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 75 мкг/кг; ▩ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 125 мкг/кг; ▪ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 150 мкг/кг; ▫ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 175 мкг/кг. Значения показателей приведены на 5-е сут после введения цитостатика относительно значений показателей у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (ЦФ + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 2. Effect of the rhGM-CSF preparation at the doses of 50–175 µg/kg on the peripheral blood values in CBA/Calac mice exposed to cyclophosphamide. ■ cyclophosphamide + saline solution; □ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 50 µg/kg; ▨ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 75 µg/kg; ▩ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 125 µg/kg; ▪ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 150 µg/kg; ▫ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 175 µg/kg. The values obtained on the 5th day after administration of the cytostatic agent are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

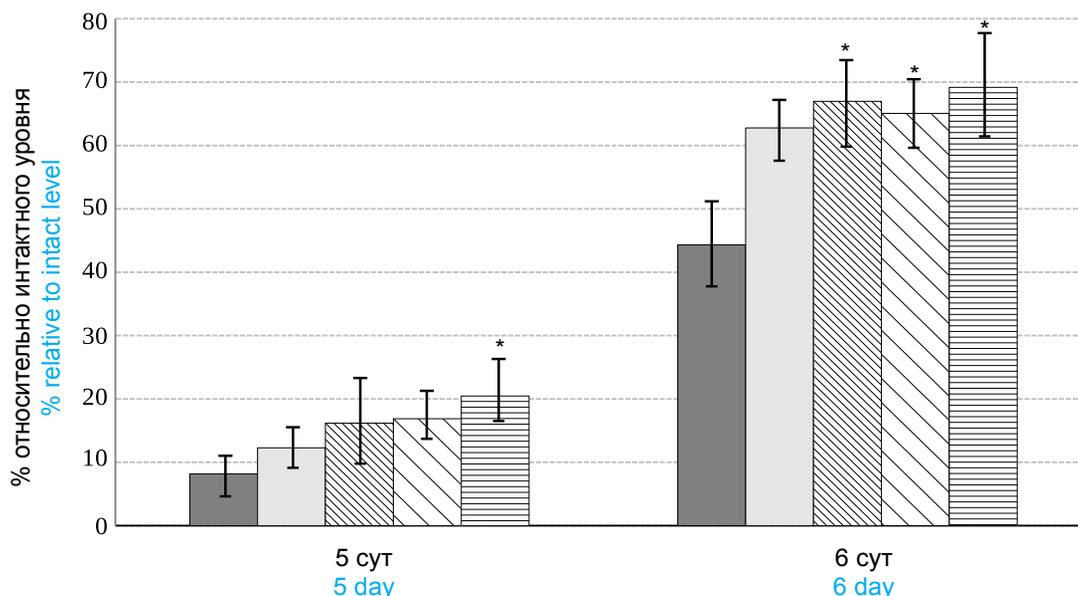


Рис. 3. Влияние препарата рчГМ-КСФ в дозах 1–90 мкг/кг на общее количество лейкоцитов в периферической крови мышей СВА/Calac, подвергшихся воздействию циклофосфана. ■ циклофосфан + физиологический раствор; □ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 1 мкг/кг; ▨ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 10 мкг/кг; ▩ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 30 мкг/кг; ▪ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 90 мкг/кг. Значения показателя приведены на 5-е и 6-е сут после введения цитостатика относительно значений показателя у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (циклофосфан + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 3. Effect of the rhGM-CSF preparation at the doses of 1–90 µg/kg on the total number of leukocytes in the peripheral blood of CBA/Calac mice exposed to cyclophosphamide. ■ cyclophosphamide + saline solution; □ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 1 µg/kg; ▨ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 10 µg/kg; ▩ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 30 µg/kg; ▪ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 90 µg/kg. The values obtained on the 5th day after administration of the cytostatic agent are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

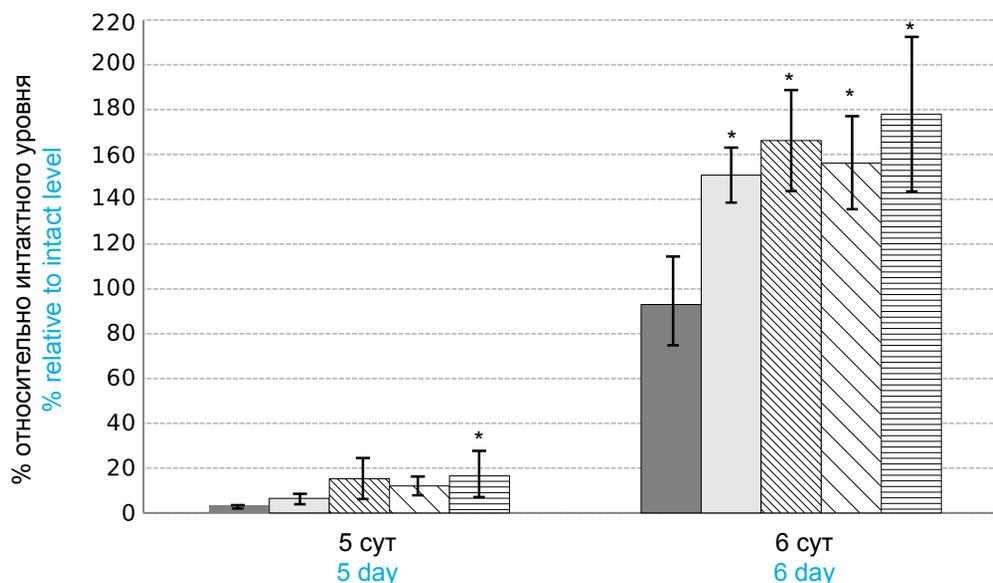


Рис. 4. Влияние препарата рчГМ-КСФ в дозах 1–90 мкг/кг на общее количество сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови мышей СВА/Calac, подвергшихся воздействию циклофосфана. ■ циклофосфан + физиологический раствор; □ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 1 мкг/кг; ▨ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 10 мкг/кг; ▩ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 30 мкг/кг; ▪ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 90 мкг/кг. Значения показателя приведены на 5-е и 6-е сут после введения цитостатика относительно значений показателя у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (циклофосфан + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 4. Effect of the rhGM-CSF preparation at the doses of 1–90 µg/kg on the total number of segmentonuclear neutrophils in the peripheral blood of CBA/Calac mice exposed to cyclophosphamide. ■ cyclophosphamide + saline solution; □ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 1 µg/kg; ▨ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 10 µg/kg; ▩ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 30 µg/kg; ▪ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 90 µg/kg. The values obtained on days 5 and 6 after administration of the cytostatic agent are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

и нейтрофилов на 5-е сутки после введения ЦФ в крови мышей этой группы возрастало по сравнению с контролем соответственно в 2,8 и 6 раз, на 6-е сутки — в 1,6 и 1,9 раза.

Ни в один из периодов наблюдения не было обнаружено достоверных различий между опытными и контрольной группами мышей в содержании моноцитов крови, хотя тенденция к увеличению показателя на 5-е сутки после введения ЦФ была выраженной (число моноцитов в группах мышей, которым вводили препарат рчГМ-КСФ в дозах от 1 до 90 мкг/кг, в 2,4–3 раза превышало уровень этого показателя в контроле).

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованный препарат рчГМ-КСФ проявляет выраженные гемостимулирующие свойства, ускоряя восстановление общего числа лейкоцитов и нейтрофилов периферической крови мышей на фоне цитостатической миелосупрессии.

Выводы

1. Установлено, что препарат рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониястимулирующего фактора человека, полученный по улучшенной технологии, усиливал пролиферативную активность клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60.

2. В системе *in vivo* продемонстрирована способность препарата рчГМ-КСФ стимулировать восстановление процессов гемопоэза в условиях его ингибирования введением цитостатика циклофосфана, что проявлялось в повышении общего числа лейкоцитов и нейтрофилов периферической крови мышей СВА/Calac. Определен диапазон эффективных доз и схема применения препарата, оптимальные для обеспечения его гемостимулирующей активности.

Вклад авторов. Г. Г. Шими́на — проведение экспериментальных исследований *in vivo*, анализ и систематизация экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, работа с графическим материалом, написание текста статьи и ее оформление; А. В. Батенева — сбор, анализ и обобщение данных литературы, проведение экспериментальных исследований *in vitro*, анализ и систематизация экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, написание текста статьи; С. Г. Гамале́й — планирование и разработка дизайна экспериментального исследования, формулировка темы исследования, сбор данных литературы, разработка дизайна статьи, доработка текста статьи; Т. И. Еси́на — получение препарата рчГМ-КСФ для исследования; Т. Г. Терещенко — характеристика препарата рчГМ-КСФ по физико-химическим показателям; Е. Д. Даниленко — утверждение темы и плана экспериментального исследования, обобщение и систематизация результатов исследования, редактирование и критический пересмотр содержания текста статьи, формулирование выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Galina G. Shimina—performing experiments *in vivo*, analysis and systematisation of experimental data, interpretation of the study results, preparation of the graphic material, writing and formatting the text of the paper; Alena V. Bateneva—collection, analysis, and systematisation of literature data, performing experiments *in vitro*, analysis and systematisation of experimental data, interpretation of the study results, writing the text of the paper; Svetlana G. Gamaley—planning and development of the design of experiments, elaboration of the study idea, collection of literature data, development of the paper design, revision and editing of the text; Tatyana I. Esina—production of the rhGM-CSF preparation for the study; Tatyana G. Tereshchenko—physical and chemical characterisation of the rhGM-CSF preparation; Elena D. Danilenko—ap-

proval of the idea and plan of the experimental part of the study, summarising and systematisation of the study results; editing and revision of the text, formulation of conclusions, approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора № 13/18 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118062290093-9).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 13/18 and was supported by the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (R&D public accounting No. АААА-А18-118062290093-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Багрова СГ. Гранулоцитарные колониестимулирующие факторы в профилактике фебрильной нейтропении. *Эффективная фармакотерапия*. 2015;(31):6–15. [Bagrova SG. Granulocyte colony-stimulating factors in prevention of febrile neutropenia. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*. 2015;(31):6–15 (In Russ.)]
2. Мальцев ДВ. Показания к применению колониестимулирующих факторов в клинической практике. *Клиническая иммунология, аллергология и инфектология*. 2018;(1):5–12. [Maltsev DV. Indications for the use of colony-stimulating factors in clinical practice. *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya = Clinical Immunology. Allergology. Infectology*. 2018;(1):5–12 (In Russ.)]
3. Половинкина ВС, Косоруков ВС. Рекомбинантный чГМ-КСФ в онкологии. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009;8(1):29–39. [Polovinkina VS, Kosorukov VS. Recombinant hGM-CSF in antitumor therapy. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2009;8(1):29–39 (In Russ.)]
4. Газатова НД, Меняйло МЕ, Малащенко ВВ, Гончаров АГ, Мелашенко ОБ, Морозова ЕМ, Селедцов ВИ. Прямые эффекты гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора на функциональные свойства моноцитов/макрофагов человека. *Медицинская иммунология*. 2019;21(3):419–26. [Gazatova ND, Meniailo ME, Malashchenko VV, Goncharov AG, Melashchenko OB, Morozova EM, Seledtsov VI. Direct effects of GM-CSF on the functions of human monocytes/macrophages. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2019;21(3):419–26 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-3-419-426>
5. Warren TL, Weiner GJ. Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development. *Curr Opin Hematol*. 2000;7(3):168–73. <https://doi.org/10.1097/00062752-200005000-00007>
6. Белогурова МБ. Клиническое использование гемопоэтических ростовых факторов. *Практическая онкология*. 2003;4(3):183–90. [Belogurova MB. Clinical use of hematopoietic growth factors. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*. 2003;4(3):183–90 (In Russ.)]
7. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol*. 2014;31(1):774. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0774-6>
8. Libby RT, Braedt G, Kronheim SR, March CJ, Urdal DL, Chiaverotti SR, et al. Expression and purification of native human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from an *Escherichia coli* secretion vector. *DNA*. 1987;6(3):221–9. <https://doi.org/10.1089/dna.1987.6.221>
9. Delamarter J, Ernst JF. Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor-like polypeptides and process for producing them in high yields in microbial cells. WO1987002060. 1987.
10. Есина ТИ, Лебедев ЛР, Волосникова ЕА, Гилева ИП, Гогина ЯС, Терещенко ТА и др. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. *Биотехнология*. 2019;35(3):68–73. [Esina TI, Lebedev LR, Volosnikova EA, Gileva IP, Gogina YaS, Tereshchenko TA, et al. Method for obtaining recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biotechnologia = Biotechnology*. 2019;35(3):68–73 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-3-68-73>
11. Гилева ИП, Есина ТИ, Волосникова ЕА, Гогина ЯС, Лебедев ЛР, Даниленко ЕД. 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 IP, Esina TI, Volosnikova EA, Gogina YaS, Lebedev LR, Danilenko ED. 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 of the Russian Federation № 2708556; 2019 (In Russ.)]
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
14. Yamaguchi T, Yamaguchi T, Kogi M, Yamamoto Y, Hayakawa T. Bioassay of human granulocyte colony-stimulating factor using human promyelocytic HL-60 cells. *Biol Pharm Bull*. 1997;20(9):943–7. <https://doi.org/10.1248/bpb.20.943>
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
16. Масычева ВИ, Даниленко ЕД, Шмина ГГ, Гвоздева ТС, Алямкина ЕА, Долгова ЕВ и др. Изучение гемостимулирующей активности нуклеопротеидного комплекса, выделенного из плаценты человека. *Сибирский онкологический журнал*. 2012;(5):34–8. [Masycheva VI, Danilenko ED, Shimina GG, Gvozdeva TS, Alyamkina EA, Dolgova EV, et al. Study of hemostimulating activity of nucleoprotein complex extracted from the human placenta. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2012;(5):34–8 (In Russ.)]
17. Новицкий ВВ, Евтушенко ОМ. *Руководство к практическим занятиям по гематологии*. Томск: Сибирский медицинский университет; 1999. [Novitskiy VV, Evtushenko OM. *A guide to practical studies on hematology*. Tomsk: Siberian Medical University; 1999 (In Russ.)]
18. Гржибовский АМ. Анализ трех и более независимых групп количественных данных. *Экология человека*. 2008;(3):50–8. [Grjibovskiy AM. Analysis of three and more independent groups quantitative data. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2008;(3):50–8 (In Russ.)]
19. Гражданцева АА, Сиволобова ГФ, Ткачева АВ, Гилева ИП, Кулигина ЕВ, Рихтер ВА, Кочнева ГВ. Высокоэффективная продукция биологически активного секретруемого гранулоцитарно-макрофагаль-

- ного колониестимулирующего фактора человека рекомбинантным вирусом осповакцины. *Биотехнология*. 2015;31(5):13–21. [Grazhdantseva AA, Sivolobova GF, Tkacheva AV, Gileva IP, Kuligina EV, Rikhter VA, Kochneva GV, et al. Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte macrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus. *Biotechnologiya = Biotechnology*. 2015;31(5):13–21 (In Russ.)]
20. Веселовский ВА, Веселова ТВ, Чернавский ДС. Трехфазная (парадоксальная) дозовая зависимость реакции растительной клетки на факторы внешней среды. *Российский химический журнал*. 1999;43(5):49–54. [Veselovsky VA, Veselova TV, Chernavsky DS. Three-phase (paradoxical) dose-dependent response of a plant cell to environmental factors. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal = Russian Journal of General Chemistry*. 1999;43(5):49–54 (In Russ.)]
21. Parmiani G, Castelli C, Pilla L, Santinami M, Colombo MP, Rivoltini L. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol*. 2007;18(2):226–32. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl158>
22. Sun L, Rautela J, Delconte RB, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Carrington EM, Schenk RL, et al. GM-CSF quantity has a selective effect on granulocytic vs. monocytic myeloid development and function. *Front Immunol*. 2018;9:1922.

Об авторах / Authors

Шими́на Галина Григорьевна. Galina G. Shimina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1078-7033>

Батенева Алена Владимировна. Alena V. Bateneva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3761-7798>

Гамале́й Светлана Георгиевна. Svetlana G. Gamaley. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7441-333X>

Еси́на Татьяна Игоревна. Tatyana I. Esina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9006-8313>

Терещенко Татьяна Геннадьевна. Tatyana G. Tereshchenko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4586-0875>

Даниленко Елена Дмитриевна, канд. биол. наук. Elena D. Danilenko, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Поступила 12.10.2020

После доработки 18.11.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Received 12 October 2020

Revised 18 November 2020

Accepted 4 December 2020