

Ранозаживляющие свойства химерной формы GM-CSF человека на модели ожоговой травмы у крыс

М.Б. Пыхтина¹, С.М. Мирошниченко¹, М.А. Карпов^{1,2}, А.А. Абышев^{1,2}, К.И. Мосалев¹
М.В. Котова¹, А.Б. Беклемишев¹, Р.А. Князев¹

¹ ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины

630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Резюме

Термические ожоги являются одной из распространенных видов травм человека, вызывая в тяжелых случаях обширный иммунный ответ как локально в ране, так и системно. Актуальной задачей остается поиск новых средств местного лечения ожоговых ран. Цель исследования – изучить ранозаживляющие свойства рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (γGM-CSF), а также его пролонгированной химерной формы с аполипопротеином AI человека (γGM-CSF-apoAI) на модели ожоговой травмы у крыс. **Материал и методы.** В работе использовали γGM-CSF и γGM-CSF-apoAI, полученные экспрессией в дрожжах *P. pastoris*. Исследование выполнялось на 27 крысах Wistar, которым моделировали ожоги III степени. Ранозаживляющее действие рекомбинантных цитокинов оценивали морфологически, а также определяли экспрессию генов цитокинов – маркеров течения раневого процесса и ангиогенеза. **Результаты и их обсуждение.** γGM-CSF на модели ожога крыс проявлял как свойства цитокина, влияющего на ангиогенез, повышая количество сосудов, так и, являясь чужеродным белком, стимулировал иммунный ответ, увеличивая пролонгированно количество лимфоцитов, и поддерживал воспаление. Химерная форма цитокина γGM-CSF-apoAI угнетала воспаление, ускоряла смену фаз ранозаживления и, как следствие, снижала количество нейтрофилов к 16-м суткам. Неожиданно она способствовала созреванию сосудов, которые в данном случае имели нормальный просвет, размер и были выстланы эндотелием. Соотношение содержания мРНК генов *Angpt1* и *Angpt2* было в 1,6 раза больше в случае применения γGM-CSF-apoAI по сравнению с контролем и назначением γGM-CSF. **Заключение.** При ксеногенном введении γGM-CSF пролонгирует воспаление за счет раннего лимфоцитарного ответа на чужеродный белок и повышенного содержания нейтрофилов на более поздних сроках ранозаживления. Химерная форма γGM-CSF-apoAI снижает иммуногенность цитокина, способствуя более ранней замене нейтрофилов на макрофаги и фибробласты и стимулирует созревание полноценных кровеносных сосудов.

Ключевые слова: ожоговая рана, крысы Wistar, рекомбинантный химерный GM-CSF человека, аполипопротеин AI человека, экспрессия генов цитокинов, воспаление, ангиогенез.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы НИР №1022072600029-5-1.6.2;1.6.8 с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение №075-15-2021-691).

Автор для переписки: Пыхтина М.Б., e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

Для цитирования: Пыхтина М.Б., Мирошниченко С.М., Карпов М.А., Абышев А.А., Мосалев К.И., Котова М.В., Беклемишев А.Б., Князев Р.А. Ранозаживляющие свойства химерной формы GM-CSF человека на модели ожоговой травмы у крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2024;44(6):146–154. doi: 10.18699/SSMJ20240614

Wound healing properties of a chimeric form of human GM-CSF in a rat burn injury model

М.Б. Pykhtina¹, S.M. Miroshnichenko¹, M.A. Karpov^{1,2}, A.A. Abyshev^{1,2}, K.I. Mosalev¹,
M.V. Kotova¹, A.B. Beklemishev¹, R.A. Knyazev¹

¹ Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakova st., 2

² Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

Abstract

Thermal burns are one of the common types of human injuries, causing in severe cases an extensive immune response both locally in the wound and having a systemic effect. The search for new means of local treatment of burn wounds remains an urgent task. The aim of this study was to investigate the wound healing properties of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (ryGM-CSF) and its prolonged chimeric form with human apolipoprotein AI (ryGM-CSF-apoAI) on the model of burn injury in rats. **Material and methods.** ryGM-CSF and ryGM-CSF-apoAI obtained by expression in yeast *P. pastoris* were used in this work. The study was performed on 27 Wistar rats, which were modeled burns of III degree. The wound-healing effect of recombinant cytokines was evaluated morphologically, and the expression of cytokine genes - markers of the course of the wound process and angiogenesis - was measured. **Results and discussion.** ryGM-CSF is known to accelerate wound healing. Human rGM-CSF on the rat burn model showed both the properties of a cytokine influencing angiogenesis, increasing the number of vessels, and being a foreign protein stimulated the immune response, increasing prolonged the number of lymphocytes and supporting inflammation. The chimeric form of cytokine ryGM-CSF-apoAI reduced inflammation, accelerated the change of wound healing phases and, as a consequence, reduced the number of neutrophils by 16 days. Unexpectedly, it induced maturation of vessels, which in this case had normal lumen, size, and were lined with endothelium. The ratio *Angpt1* and *Angpt2* gene mRNA content was 2-fold higher when ryGM-CSF-apoAI was used, compared to control and ryGM-CSF administration. **Conclusions.** With xenogeneous administration, recombinant human GM-CSF prolongs inflammation due to early lymphocytic response to foreign protein and increased neutrophil content at later wound healing periods. The chimeric form ryGM-CSF-apoAI reduces cytokine immunogenicity by promoting earlier replacement of neutrophils by macrophages and fibroblasts and stimulates maturation of high-grade blood vessels.

Key words: burn wound, Wistar rats, recombinant human chimeric GM-CSF, human apolipoprotein AI, cytokine gene expression, inflammation, angiogenesis.

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

Financing. The work was carried out according to state assignment № 1022072600029-5-1.6.2;1.6.8 using the equipment of the Proteomic Analysis Collective Use Center, supported by funding from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2021-691).

Correspondence author: Pykhtina M.B., e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

Citation: Pykhtina M.B., Miroshnichenko S.M., Karpov M.A., Abyshv A.A., Mosalev K.I. Kotova M.V., Beklemishev A.B., Knyazev R.A. Wound healing properties of a chimeric form of human GM-CSF in a rat burn injury model. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(6):146–154. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20240614

Введение

По данным ВОЗ, ожоговые травмы остаются одними из самых сложных проблем общественного здравоохранения, ежегодно приводя к смерти до 300 000 человек [1]. Основной причиной летального исхода в первые 24 ч после ожога является сепсис и сопутствующая инвазивная инфекция [2], вызываемая проникновением возбудителей в поврежденную кожу, лишенную защитной функции [3]. Заживление ожоговой раны представляет собой динамичный процесс, включающий ряд сложных клеточных и молекулярных событий, в значительной степени перекрывающихся и взаимозависимых [4]. Цитокины и факторы роста играют значительную роль в этом процессе, однако их биодоступность в раневом ложе обычно недостаточна из-за снижения синтеза и/или чрезмерной деградации [5].

В настоящее время существует ряд исследований, демонстрирующих успешное применение экзогенных факторов роста при лечении ожоговых ран [6–8]. GM-CSF является многофункциональным цитокином и широко используется в клинической практике, в частности, при лечении фебрильной нейтропении или для индукции созревания дендритных клеток. Между тем использование GM-CSF во многом ограничено большим количеством побочных эффектов, что затрудняет его пероральное применение. Наряду с системным назначением GM-CSF весьма успешно используется локально, в частности, для лечения кожных ран самой различной этиологии. Исследования *in vivo* показали, что GM-CSF индуцирует дифференцировку миофибробластов, тем самым способствуя сокращению раны [9], усиливает хемотаксис нейтрофилов и макрофагов

и повышает местный иммунитет ран [10], индуцирует пролиферацию кератиноцитов и эпителиальных клеток [11]. Сверхэкспрессия GM-CSF у мышей приводила к усилению реэпителизации и контракции ран, тогда как дефицит цитокина значительно ухудшал ранозаживление [12]. Также GM-CSF показал высокую эффективность в клинических исследованиях при лечении ожоговых ран и диабетических язв [13–15].

В целях повышения стабильности и снижения побочных эффектов ростовых факторов молекулы цитокинов модифицируют полиэтиленгликолем или генно-инженерным слиянием с белками крови, такими как альбумин или иммуноглобулины [16]. Нами получен новый химерный полипептид, содержащий GM-CSF, слитый с аполипопротеином AI (апо AI), в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*. Как показано в работе [17], химерный белок не только проявлял свойства GM-CSF как колониестимулирующий фактор, но также усиливал пролиферацию клеток и снижал апоптоз.

В данной работе исследованы ранозаживляющие свойства рекомбинантного GM-CSF (ryGM-CSF) и его химерной формы с апо AI (ryGM-CSF-apoAI) на модели ожоговой раны крыс Wistar.

Материал и методы

Исследование проведено в соответствии с этическими нормами, изложенными в Хельсинкской декларации, и одобрено Комитетом по био-медицинской этике ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (заключение № 58 от 16.09.2024).

Эксперименты по моделированию ожогов проводились на 27 крысах Wistar массой 300–350 г, случайно распределенных на три группы: группа I (контрольная; $n = 9$) получала физиологический раствор с 10 % глицерина, группа II ($n = 9$) – раствор ryGM-CSF в 10%-м глицерине, группа III ($n = 9$) – раствор ryGM-CSF-ApoA-I в 10%-м глицерине. В области спины каждого животного формировали по две ожоговые раны, на каждую из трех временных точек (3-и, 16-е и 25-е сутки) было по три крысы из каждой группы. Раны моделировали при использовании золетил-ксилазинового наркоза (золетил 20 мг/кг и ксилазин 10 мг/кг внутривенно). Термический ожог вызывали на выбранном участке спины площадью 1 см² путем аппликации нагретого в кипятке металлического груза массой 110 г на 4 с. Такая экспозиция обеспечивала формирование ожога III степени клинической классификации ожогов (распространяется на поверхностные структуры сетчатого слоя дермы).

Препараты рекомбинантных белков (4 мкг/мл ryGM-CSF и 11,2 мкг/мл ryGM-CSF-apoAI, получены биосинтезом в дрожжах *P. pastoris* [17]) или контрольный раствор по 100 мкл равномерно наносили аппликатором на область поражения с захватом здоровых тканей, начиная с первых и до 25-х суток эксперимента. Изменения стадий ранозаживления регистрировали на 3-е, 16-е и 25-е сутки: измеряли площадь раны, осуществляли забор биоптатов кожи для определения экспрессии цитокинов – маркеров раневого процесса, а также для проведения гистологического исследования.

Материал для гистологического исследования забирали на границе между здоровой и поврежденной тканью, фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, после чего подвергали стандартной гистологической проводке через серию этиловых спиртов возрастающей концентрации, ксилол и заключали в парафин. Из полученных парафиновых блоков на микротоме Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США) получали срезы толщиной 5–7 мкм, которые укладывали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином и изучали в микроскопе AxioStar (Carl Zeiss, Германия) при комбинированном увеличении в 200 и 400 раз. Подсчитывали численную плотность клеток (Nai) в воспалительных инфильтратах, учитывали макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы при помощи морфометрической сетки с тестовой площадью 1600 мкм² при увеличении в 400 раз (количество полей – 30). Толщину эпидермиса измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ.

РНК из биоптатов кожи крыс выделяли с использованием реагента «Лира» («Биолабмикс»), согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов ОТ М-MuLV-RH («Биолабмикс»). Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени выполняли с использованием «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)» («Биолабмикс»). Условия амплификации для генов были следующими: денатурация – 95 °C 5 мин; 45 циклов (денатурация: 95 °C 10 с, отжиг при 57 °C 15 с, элонгация цепи при 72 °C 15 с). В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Исследовали экспрессию генов *IL1β*, *Tnf*, *Vegfa*, *Angpt1*, *Angpt2*. Использованные праймеры представлены в табл. 1.

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ STATISTICA 12 (StatSoft Inc., США). Тип распределения данных определяли при помощи критерия Шапиро – Уилка. Переменные представлены при нормальном распределении в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm m$), при распре-

Таблица 1. Последовательности прямых (F) и обратных (R) праймеров, использованных для оценки экспрессии генов цитокинов

Table 1. Forward (F) and reverse (R) primer sequences used to assess cytokine gene expression

Ген	Последовательность праймеров
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTT-3' R: 5'-GGGCCATCCACAGTCTTCT-3'
<i>Il1b</i>	F: 5'-GACCCAAGCACCTTCTTT-3' R: 5'-GAATACCACTTGTGGCTTATG-3'
<i>Tnf</i>	F: 5'-GGAAAGCATGATCCGAGATGT-3' R: 5'-CATTTGGGAACCTCTCCTCCT-3'
<i>Angpt1</i>	F: 5'-GTGGAGACCCAGGTACTAAATC-3' R: 5'-TTCAAGGTGTCCAGCTCTTC-3'
<i>Angpt2</i>	F: 5'-GCTCTGTTGCTGTCCCTAAA-3' R: 5'-CCGAAGCCCTCTTTGTACTC-3'
<i>Vegfa</i>	F: 5'-TATCTTCAAGCCGCTCCTGTGT-3' R: 5'-GATCCGCATGATCTGCATAGTG-3'

делении, отличном от нормального – в виде медианы и межквартильных интервалов (Me [25 %; 75 %]), для оценки различий использовали соответственно t-критерий Стьюдента и критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Морфологическое описание ожоговых ран

Описание гистологических препаратов

Для забора гистологических препаратов ожоговых ран были выбраны третьи сутки, с выраженной воспалительной фазой течения раневого процесса. В контрольных образцах наблюдался истонченный эпидермис и обширная зона некроза. В дерме присутствовал выраженный отек, сопровождаемый густой инфильтрацией нейтрофилами и некрозом (рис.1, К). Подкожная жировая клетчатка, расположенная на границе с дермой, была инфильтрирована нейтрофилами и лимфоцитами. В присутствии γ GM-CSF также наблюдались истонченный эпидермис и зона некроза, достигающая глубоких слоев дермы и границы с мышечной тканью. В дерме присутствовал отек и фибриноидный некроз коллагена. Периферию очага некроза сопровождала неравномерная инфильтрация, преимущественно нейтрофилами. Подкожная жировая клетчатка была инфильтрирована лимфоцитами и макрофагами (см. рис.1, γ GM-CSF). В присутствии GMA обширная зона некроза наблюдалась по центру срезов и охватывала часть сетчатого слоя дермы с придатками кожи. В подкожной жировой клетчатке, как и в

случае с GM, проявлялась лимфомакрофагальная инфильтрация.

К 16-м суткам в контрольных образцах наблюдался обширный очаг некроза, охватывающий сетчатый слой дермы и сопровождающийся густой инфильтрацией нейтрофилами на границе с очагом некроза (см. рис.1, К). В дерме сохранялся отек соединительной ткани. Глубже располагались хаотичные очаги плотной грубоволокнистой соединительной и грануляционной ткани, диффузно инфильтрированной лимфоцитами, макрофагами с примесью нейтрофилов и эозинофилов и редкими клетками фибробластического ряда, расположенными хаотично. В присутствии γ GM-CSF также наблюдался обширный очаг некроза, достигающий глубоких слоев дермы и отграниченный от подлежащего коллагена густой инфильтрацией нейтрофилами. На границе с мышечной тканью отмечались очаговое разрастание грубоволокнистой соединительной ткани с отеком, клетки фибробластического ряда, очаги грануляционной ткани с многочисленными мелкими капиллярами и диффузной лимфомакрофагальной инфильтрацией с примесью нейтрофилов и эозинофилов. В образцах кожи, обработанных γ GM-CSF-ароAI, очаг некроза располагался поверхностно, в пределах сосочкового слоя дермы с небольшой демаркационной инфильтрацией нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами. На границе очага некроза и дермы выявлялись отчетливые очаги грануляционной ткани. Неравномерное разрастание грубоволокнистой соединительной ткани с отеком сопровождалось равномерным распределением клеток фибробластического ряда, встречались уже как мелкие капилляры, так и крупные сосуды, выстланные эндотелием (см. рис. 1).

На 25-е сутки ранозаживления наступает фаза эпителизации и ремоделирования раны. В контроле поверхность области ожоговой травмы покрыта слоем эпидермиса. В дерме наблюдалось разрастание грубоволокнистой соединительной ткани с равномерным распределением клеток фибробластического ряда; также присутствовало небольшое количество мелких сосудов капиллярного типа. Все слои дермы были инфильтрированы лимфоцитами и макрофагами. В подкожной жировой ткани наблюдалась воспалительная инфильтрация с очагами склероза. В образцах кожи, обработанных γ GM-CSF, область ожогового дефекта также была покрыта эпидермисом. В поверхностных слоях дермы отмечено очаговое разрастание грубоволокнистой соединительной ткани с равномерным распределением клеток фибробластического ряда, преимущественно ориентированных горизонтально. На рис. 1 отмечено

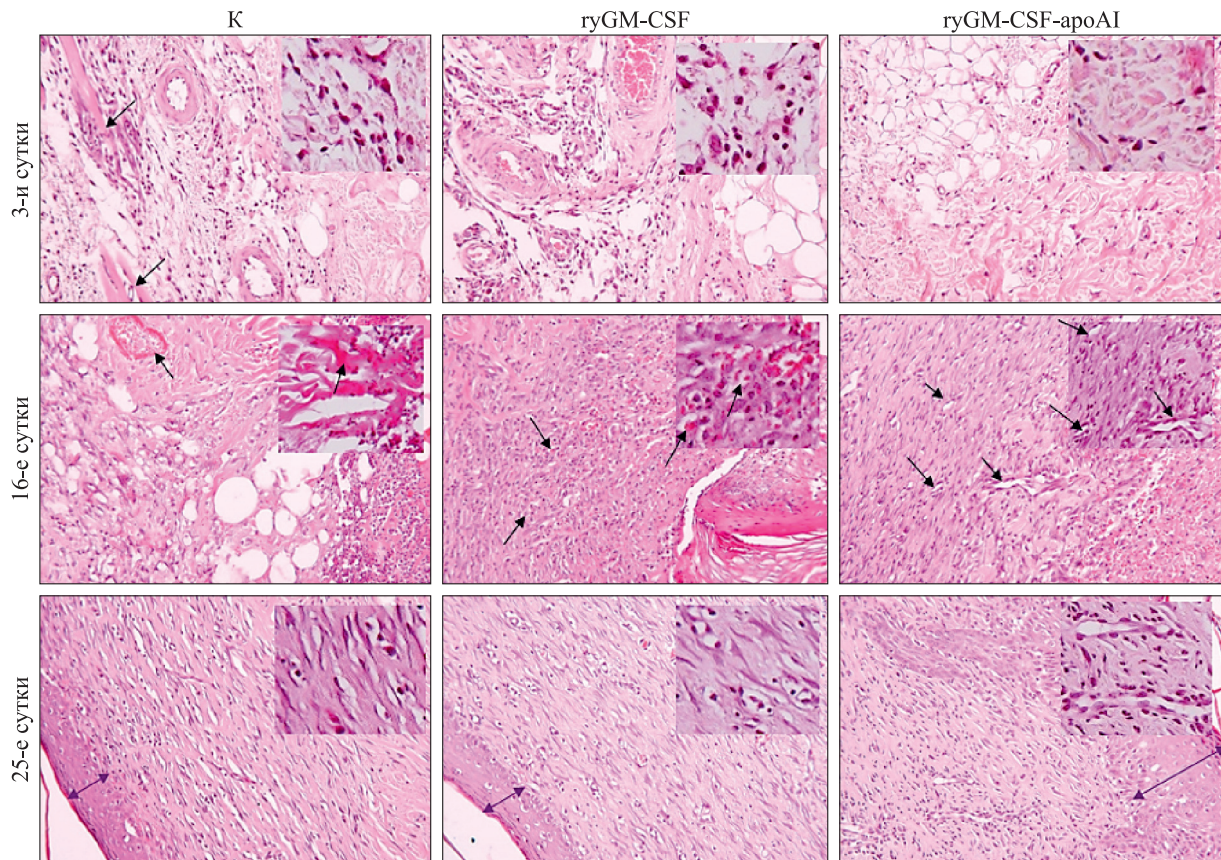


Рис. 1. Морфологические изменения в коже крыс при термическом ожоге 3А степени. Третьи сутки: К (контроль) – отек, воспалительная инфильтрация, некрозы структур (стрелки); ryGM-CSF – воспалительная инфильтрация; ryGM-CSF-apoAI – рассеянная инфильтрация. 16-е сутки: К – отек, воспалительная инфильтрация, некрозы дермы и сосудов (стрелки); ryGM-CSF – мелкие, щелевидные незрелые сосуды капиллярного типа (стрелки); ryGM-CSF-apoAI – крупные сосуды, выстланные эндотелием, чередующиеся с мелкими сосудами (стрелки). 25-е сутки: К – щелевидные сосуды с узкими просветами, выстланные эндотелием; ryGM-CSF – обилие мелких сосудов, выстланных эндотелием, и незрелые сосуды; ryGM-CSF-apoAI – обилие мелких и крупных сосудов, выстланных эндотелием; рассеянная инфильтрация, очаг гиперплазии эпидермиса. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$

Fig.1. Morphologic changes in the skin of rats in thermal burn of 3A degree. 3 day: K (control) – edema, inflammatory infiltration, necrosis of structures (arrows); GM – inflammatory infiltration; ryGM-CSF-apoAI – diffuse infiltration. Day 16: K – edema, inflammatory infiltration, necrosis of dermis and vessels (arrows); ryGM-CSF – small, slit-shaped immature capillary-type vessels (arrows); ryGM-CSF-apoAI – large endothelium-lined vessels alternating with small vessels (arrows). 25 day: K – slit-shaped vessels with narrow lumen, lined with endothelium; ryGM-CSF – abundance of small vessels lined with endothelium and immature vessels; ryGM-CSF-apoAI – abundance of small and large vessels lined with endothelium; scattered infiltration, epidermal hyperplasia. Hematoxylin and eosin staining, magnification $\times 200$

большое количество хаотично расположенных мелких капилляров и рассеянная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация с примесью редких нейтрофилов.

В присутствии химерной формы к окончанию эксперимента область дефекта также была эпителизирована. Фибробласты располагались равномерно и ориентировались горизонтально. Отмечено большое количество хаотично расположенных мелких капилляров и присутствие зрелых

капилляров, выстланных эпителием. Инфильтрация была представлена рассеянными лимфоцитами и макрофагами. По краю формирующегося рубца определялась гиперплазия эпидермиса с акантозом. Толщина эпидермиса к 25-м суткам эксперимента была максимальна в присутствии ryGM-CSF-apoAI ($24,5 \pm 2,35$ мкм), в то время как под действием ryGM-CSF и в контроле – $14,7 \pm 2,45$ и $16,6 \pm 1,8$ мкм соответственно. Сокращение площади раны под влиянием рекомби-

нантных цитокинов происходило неравномерно. Начало контракции раны в присутствии γ GM-CSF- α AI наблюдалось на 4-е сутки и в 1,9 раза превосходило контроль. На 19-е сутки закрылась рана у одной крысы из группы γ GM-CSF- α AI, в то время как второе животное из данной группы сорвало остатки струпа и на 19-е сутки имело размер раны 4 мм². К 21-м суткам в группе γ GM-CSF площадь ран составила $8,3 \pm 2$ мм², в группе контроля – $6,2 \pm 1,5$ мм², в то время как в группе γ GM-CSF- α AI произошло полное заживление ран у двух животных. На 25-е сутки у всех животных из контрольной группы и группы γ GM-CSF- α AI раны полностью закрылись, в то время как в группе γ GM-CSF одно животное имело лишь частичное закрытие раны (1 мм²). Таким образом, более ранняя контракция раны произошла в присутствии химерного цитокина к 21-м суткам эксперимента.

Клеточный состав ожоговых ран

Численная плотность нейтрофилов была наименьшей в области ожога кожи у крыс, обрабо-

танных γ GM-CSF, при этом количество лимфоцитов было в 4,6 раза больше, чем в коже крыс, обработанных γ GM-CSF- α AI, на третьи сутки эксперимента (табл. 2). Данный факт, возможно, объясняется тем, что используемый в наших экспериментах γ GM-CSF имеет не более 56 % гомологии с цитокином грызунов, в то время как α AI относится к высококонсервативным белкам. Поэтому ранняя и пролонгированная инфильтрация лимфоцитами, возможно, стимулирована иммунным ответом крысы на чужеродный белок. Количество макрофагов на третьи сутки эксперимента было минимальным по отношению к другим клеткам инфильтрата, статистически значимых различий между опытными и контрольной группами не выявлено.

Анализ клеточного состава инфильтрата на 16-е сутки показал, что процессы ранозаживления в контроле и под действием γ GM-CSF- α AI идут параллельно и сопровождаются значительным падением количества нейтрофилов, ростом числа лимфоцитов и макрофагов (см. табл. 2).

Таблица 2. Численная плотность клеток (N_{ai}) в инфильтратах кожи в разные сроки ранозаживления

Table 2. Cell density (N_{ai}) in skin infiltrates at different stages of wound healing

Группа	3-и сутки	p	16-е сутки	p	25-е сутки	p
Лимфоциты						
К (1)	0,00 [0,00; 3,57]	$p_{1-2} = 0,0000$; $p_{1-3} = 0,0000$; $p_{2-3} = 0,0000$	50,00 [41,67; 60,00]	$p_{1-2} = 0,00015$; $p_{1-3} = 0,0006$ GMA/GM $p = 0,000$	50,00 [33,33; 75,00]	
ryGM-CSF (2)	30,00 [22,22; 44,44]		20,00 [14,29; 30,77]		63,33 [25,00; 100,00]	
ryGM-CSF- apoAI (3)	6,46 [3,45; 9,09]		69,05 [60,00; 80,00]		66,67 [33,33; 75,00]	
Нейтрофилы						
К (1)	98,44 [95,24; 100,00]	$p_{1-2} = 0,000$	14,29 [0,00; 25,00]	$p_{1-2} = 0,0004$ $p_{1-3} = 0,000001$ $p_{2-3} = 0,0000$	0,00 [0,00; 0,00]	
ryGM-CSF (2)	61,54 [50,00; 75,00]	$p_{1-3} = 0,000$	60,77 [0,00; 71,43]		0,00 [0,00; 0,00]	
ryGM-CSF- apoAI (3)	89,64 [85,30; 94,12]	$p_{2-3} = 0,000$	0,00 [0,00; 0,00]		0,00 [0,00; 0,00]	
Макрофаги						
К (1)	0,00 [0,00; 3,23]	$p_{1-2} = 0,031$; $p_{1-3} = 0,0028$	33,33 [20,00; 50,00]	$p_{1-2} = 0,00023$ $p_{2-3} = 0,00017$	36,67 [0,00; 57,14]	
ryGM-CSF (2)	0,00 [0,00; 11,11]		13,96 [8,33; 21,43]		33,33 [0,00; 66,67]	
ryGM-CSF- apoAI (3)	3,85 [0,00; 5,88]		30,95 [20,00 40,00]		33,33 [25,00; 66,67]	
Фибробласты						
К (1)	0,00 [0,00; 0,00]		28,57 [16,60; 42,90]	$p_{1-2} = 0,0130$; $p_{2-3} = 0,0180$	66,67 [56,25; 78,6]	$p_{1-2} = 0,0097$; $p_{2-3} = 0,0000$
ryGM-CSF (2)	0,00 [0,00; 0,00]		5,13 [0,00; 16,67]		55,05 [40,00; 69,23]	
ryGM-CSF- apoAI (3)	0,00 [0,00; 0,00]		26,79 [16,67; 50,00]		74,54 [66,67; 77,80]	

Динамика клеточного состава в присутствии γ GM-CSF несколько отличалась. Увеличение количества макрофагов сопровождалось незначительным снижением количества нейтрофилов. Модулирующая активность γ GM-CSF, влияющая на смену фаз ранозаживления, в данном случае искажалась иммуногенностью белка, который поддерживал постоянный высокий уровень лимфоцитов при повышении количества макрофагов и, соответственно, более низкий уровень фибробластов на 25-е сутки эксперимента (см. табл. 2).

Влияние рекомбинантных ГМ-КСФ на экспрессию генов цитокинов в коже

γ GM-CSF и его химерная форма снижали экспрессию гена *IL1b* на 16-е сутки после ожоговой травмы по сравнению с контролем (рис. 2, а). Однако к 25-м суткам эксперимента содержание мРНК гена *IL1b* в присутствии γ GM-CSF несколько увеличилось. IL-1 β участвует не только в ремоделировании внеклеточного матрикса, но и в фиброгенезе. Увеличение его содержания характерно для пациентов в течение первой недели после ожоговой травмы [18]. Сверхэкспрессия

цитокина наблюдается не только в ранней воспалительной фазе нормального заживления ран, но и при нарушении заживления ран и фиброзе [19], в связи с чем он считается предиктором формирования гипертрофических рубцов после ожогов [20]. Некоторое уменьшение содержания мРНК IL-1 β под действием γ GM-CSF-ароAI сочеталось с более низким уровнем нейтрофилов на 16-е сутки эксперимента (см. табл. 2). TNF- α , мощный провоспалительный цитокин, рекрутирующий лейкоциты в место повреждения и усиливающий экспрессию ряда цитокинов, может негативно влиять на процесс ранозаживления посредством различных механизмов, включая снижение уровня коллагена и индукцию экспрессии матриксных металлопротеиназ [21]. На 16-е сутки эксперимента не обнаружено статистически значимых различий в уровне экспрессии гена *Tnf*, однако к 25-м суткам наблюдалась тенденция к его уменьшению при обработке раны γ GM-CSF-ароAI, в то время как γ GM-CSF способствовал незначительному повышению содержания мРНК гена *TNF- α* (см. рис. 2, б).

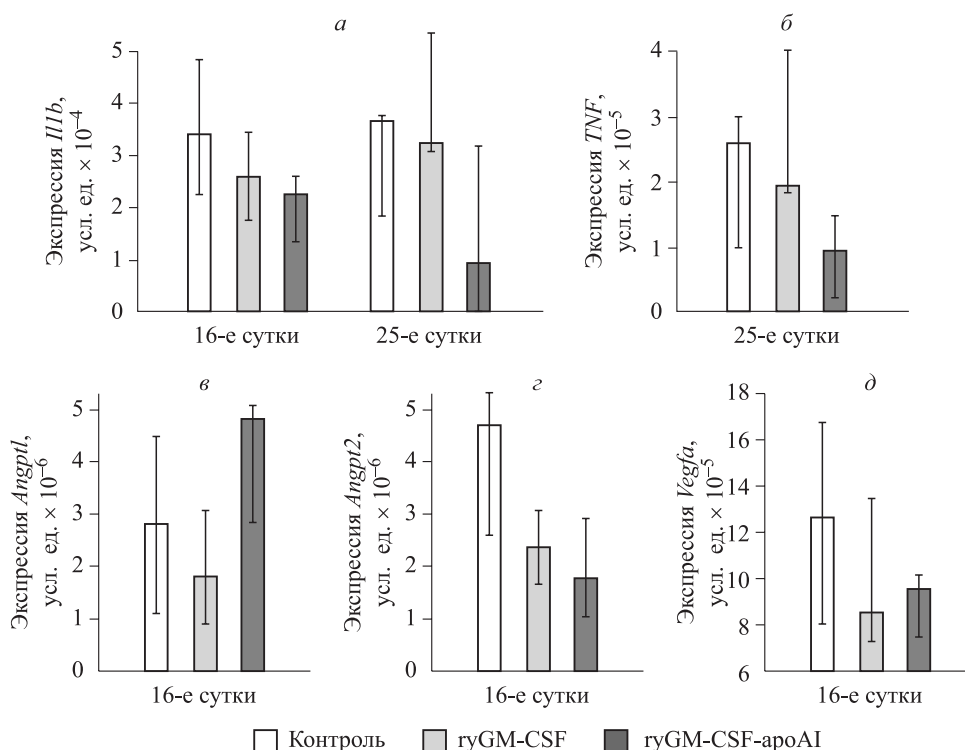


Рис. 2. Уровень экспрессии генов ($2^{-\Delta CT}$) *IL-1 β* (16-е и 25-е сутки, а) *TNF- α* (25-е сутки, б) ангиопоэтина-1 (16-е сутки, в) ангиопоэтина 2 (16-е сутки, г) *VEGF-A* (16-е сутки, д) в коже животных при ранозаживлении после обработки ожоговой раны рекомбинантными цитокинами

Fig. 3. Gene expression ($2^{-\Delta CT}$) of *IL-1 β* (16 and 25 day, а) *TNF- α* (25 day, б) *angiopoietin 1* (16 day), в) *angiopoietin 2* (16 day, г) *VEGF-A* (16 day, д) in the skin of animals during wound healing after burn wound treatment with recombinant cytokines

GM-CSF может ускорять заживление ран, способствуя ангиогенезу [22], который составляет значимую часть процесса ранозаживления. Скорость формирования, количество и качество новых кровеносных сосудов в ране напрямую влияют на этот процесс. J. Zhao et al. продемонстрировали роль VEGF и системы Ang-1/Ang-2/Tie-2 в формировании полноценных кровеносных сосудов [23]. Авторы обнаружили, что при высоком соотношении экспрессии Ang-1/Ang-2 и уровне фосфорилирования Tie2 после обработки GM-CSF микрососуды имели выраженную степень покрытия перицитами, указывая на то, что GM-CSF не только инициирует фазу прорастания сосудов, но также может способствовать созреванию и стабилизации новых микрососудов. В нашем эксперименте установлено, что уровень экспрессии гена *Vegfa*, кодирующего VEGF-A, в ране не имел статистических отличий от контроля при обработке ростовыми факторами (см. рис. 2, д). В то же время соотношение содержания мРНК генов *Angpt1* и *Angpt2* в ране крыс, обработанных γ GM-CSF-апоAI (1,38 [1,27; 2,34]), было в 1,6 раза больше ($p = 0,049$), чем в контроле (0,82 [0,48; 0,9]) и в случае обработки диким типом γ GM-CSF (0,88 [0,77; 1,0]). Данный факт может свидетельствовать о том, что рекомбинантный γ GM-CSF человека, вероятно, не способствует созреванию сосудов, хотя поддерживает образование множества мелких и не совсем зрелых сосудов, в то время как в случае с химерным белком уже на 16-е сутки отмечено появление небольшого количества зрелых сосудов, имеющих эндотелиальную выстилку (см. рис. 1, 2).

Заключение

γ GM-CSF человека при ксеногенном введении не проявил своих ранозаживляющих свойств, в то же время GM-CSF в химерной конструкции с белком апо AI не стимулировал иммунный ответ, а, скорее, способствовал более ранней замене нейтрофилов на макрофаги и фибробласты, угнетая воспаление. Неожиданно химерная форма вызывала раннее формирование зрелых полноценных сосудов, что может способствовать более качественной реорганизации рубцовой ткани и в более короткие сроки.

Список литературы / References

1. WHO. The global burden of disease 2004. Available at: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43942/9789241563710_eng.pdf
2. Norbury W., Herndon D.N., Tanksley J., Jeschke M.G., Finnerty C.C. Infection in burns. *Surg. Infect. (Larchmt.)*. 2016;17(2):250–255. doi: 10.1089/sur.2013.134
3. Boldeanu L., Boldeanu M.V., Bogdan M., Meca A.D., Coman C.G., Buca B.R., Tartau C.G., Tartau L.M. Immunological approaches and therapy in burns (review). *Exp. Ther. Med.* 2020;20(3):2361–2367. doi: 10.3892/etm.2020.8932
4. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999;341(10):738–746. doi: 10.1056/NEJM199909023411006
5. Demidova-Rice T.N., Hamblin M.R., Herman I.M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv. Skin. Wound. Care.* 2012;25(8):349–370. doi: 10.1097/01.ASW.0000418541.31366.a3
6. Holoubek J., Lipový B., Knoz M., Kempný T., Chaloupková R., Damborský J., Vojtová L. The future for the application of fibroblast growth factor 2 in modern wound healing. *Burns.* 2023; 49(2):484–486. doi: 10.1016/j.burns.2022.10.007
7. Guo H.F., Abd Hamid R., Mohd Ali R., Chang S.K., Rahman M.H., Zainal Z., Khaza'i H. Healing properties of epidermal growth factor and tocotrienol-rich fraction in deep partial-thickness experimental burn wounds. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(2):130. doi: 10.3390/antiox9020130
8. Robson M.C., Phillips T.J., Falanga V., Odenheimer D.J., Parish L.C., Jensen J.L., Steed D.L. Randomized trial of topically applied repifer-min (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair Regen.* 2001;9(5):347–352. doi: 10.1046/j.1524-475x.2001.00347.x
9. Rubbia-Brandt L., Sappino A.P., Gabbiani G. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1991;60(2):73–82. doi: 10.1007/BF02899530
10. Khajah M., Millen B., Cara D.C., Waterhouse C., McCafferty D.M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* 2011;89(6):945–953. doi: 10.1189/jlb.0809546
11. Kaplan G., Walsh G., Guido L.S., Meyn P., Burkhardt R.A., Abalos R.M. Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J. Exp. Med.* 1992;175(6):1717–1728. doi: 10.1084/jem.175.6.1717
12. Fang Y., Gong S.J., Xu Y.H., Hambly B.D., Bao S. Impaired cutaneous wound healing in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor knockout mice. *Br. J. Dermatol.* 2007;157(3):458–465. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07979.x

13. Karlafti E., Savopoulos C., Hatzitolios A., Didangelos T. Local use of granulocyte-macrophages colony stimulating factor in treatment of chronic diabetic neuropathic ulcer (case review). *Georgian Med. News*. 2018;(277):21–27.
14. Li J., Liu W., Zhang G., Wang D., Lou H., Duang J. Effectiveness of recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor for treating deep second-degree burns: a systematic review and meta-analysis. *BMJ. Mil. Health*. 2020;166(5):352–357. doi: 10.1136/bmjilitary-2019-001395
15. Yan D., Liu S., Zhao X., Bian H., Yao X., Xing J., Sun W., Chen X. Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor in deep second-degree burn wound healing. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(22):e6881. doi: 10.1097/MD.00000000000006881
16. Chuang Y.M., He L., Pinn M.L., Tsai Y.C., Cheng M.A., Farmer E., Karakousis P.C., Hung C.F. Albumin fusion with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor acts as an immunotherapy against chronic tuberculosis. *Cell. Mol. Immunol.* 2021;18(10):2393–2401. doi: 10.1038/s41423-020-0439-2
17. Pykhtina M., Miroshnichenko S., Romanov V., Grazhdantseva A., Kochneva G., Beklemishev A. Construction of recombinant human GM-CSF and GM-CSF-ApoA-I fusion protein and evaluation of their biological activity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(5):459. doi: 10.3390/ph14050459
18. Kupper T.S., Ballard D.W., Chua A.O., McGuire J.S., Flood P.M., Horowitz M.C., Langdon R., Lightfoot L., Gubler U. Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *J. Exp. Med.* 1986;164(6):2095–2100. doi: 10.1084/jem.164.6.2095
19. Salgado R.M., Alcántara L., Mendoza-Rodríguez C.A., Cerbón M., Hidalgo-González C., Mercadillo P., Moreno L.M., Álvarez-Jiménez R., Krötzsch E. Post-burn hypertrophic scars are characterized by high levels of IL-1 β mRNA and protein and TNF- α type I receptors. *Burns*. 2012;38(5):668–676. doi: 10.1016/j.burns.2011.12.012
20. Blears E., Sommerhalder C., Toliver-Kinsky T., Finnerty C.C., Herndon D.N. Current problems in burn immunology. *Curr. Probl. Surg.* 2020;57(6):100779. doi: 10.1016/j.cpsurg.2020.100779
21. Buck M., Houghlum K., Chojkier M. Tumor necrosis factor- α inhibits collagen alpha1(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am. J. Pathol.* 1996;149(1):195–204
22. Sun H., Wang X., Hu X., Yu W., You C., Hu H., Han C. Promotion of angiogenesis by sustained release of rhGM-CSF from heparinized collagen/chitosan scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2012;100(3):788–798. doi: 10.1002/jbm.b.32512
23. Zhao J., Chen L., Shu B., Tang J., Zhang L., Xie J., Qi S., Xu Y. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor influences angiogenesis by regulating the coordinated expression of VEGF and the Ang/Tie system. *PLoS. One*. 2014;9(3):e92691. doi: 10.1371/journal.pone.0092691

Информация об авторах:

Пыхтина Мария Борисовна, к.б.н., ORCID: 0000-0002-7808-9274, e-mail: pykhtina_maria@mail.ru
Мирошнichenko Светлана Михайловна, ORCID: 0000-0002-6740-8241, e-mail: svmiro@yandex.ru
Карпов Михаил Александрович, к.м.н., ORCID: 0000-0002-8200-3998, e-mail: karpov-ma@mail.ru
Абышев Александр Андреевич, ORCID: 0000-0002-8036-7990, e-mail: abyshev.alexander@mail.ru
Мосалев Кирилл Игоревич, ORCID: 0000-0001-8968-3968, e-mail: mosalevki@mail.ru
Котова Мария Владимировна, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru
Беклемишев Анатолий Борисович, д.б.н., ORCID: 0000-0001-9732-1246, e-mail: ab.beklem-46@yandex.ru
Князев Роман Александрович, к.б.н., ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: knjazev_roman@mail.ru

Information about the author:

Maria B. Pykhtina, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-7808-9274, e-mail: pykhtina_maria@mail.ru
Svetlana M. Miroshnichenko, ORCID: 0000-0002-6740-8241, e-mail: svmiro@yandex.ru
Mikhail A. Karpov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-8200-3998, e-mail: karpov-ma@mail.ru
Alexandr A. Abyshev, ORCID: 0000-0002-8036-7990, e-mail: abyshev.alexander@mail.ru
Kirill I. Mosalev, ORCID: 0000-0001-8968-3968, e-mail: mosalevki@mail.ru
Maria V. Kotova, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru
Anatoly B. Beklemishev, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0001-9732-1246, e-mail: ab.beklem-46@yandex.ru
Roman A. Knjazev, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: knjazev_roman@mail.ru

Поступила в редакцию 18.07.2024

После доработки 20.09.2024

После повторной доработки 29.10.2024

Принята к публикации 30.10.2024

Received 18.07.2024

Revision received 20.09.2024

Second revision received 29.10.2024

Accepted 30.10.2024