

РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ НЕЙТРАЛИЗУЕТ ЭФФЕКТЫ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ НА МОДЕЛИ КОСТНОМОЗГОВОГО ГЕМОПОЭЗА МЫШЕЙ BALB/C

Топоркова Л.Б.¹, Петухова А.А.¹, Гилева И.П.²,
Орловская И.А.¹

¹ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск,

² ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область

Резюме. Исследовалось влияние рекомбинантного белка мышиного TNF (rmTNF) и TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы (VARV-CrmB) на колониобразующую активность клеток костного мозга (ККМ) мышей Balb/c. Количество коммитированных предшественников оценивалось в метилцеллюлозной культуре, обогащенной ростовыми факторами в отсутствии и присутствии rmTNF в концентрациях от 2 до 40 нг/мл, VARV-CrmB в концентрациях от 2 до 24 нг/мл, а также в комбинации 2 нг/мл rmTNF+ VARV-CrmB в концентрациях от 2 до 12 нг/мл. Количество колоний гемопоэтических предшественников (БОЕ-Э, КОЕ-Э, КОЕ-ГМ) оценивалось на 14 день. VARV-CrmB в отсутствие rmTNF не оказывал влияния на костномозговое колониобразование. rmTNF во всех концентрациях ингибировал рост эритроидных колоний (БОЕ-Э+КОЕ-Э) и стимулировал рост гранулоцитарно-макрофагальных колоний (КОЕ-ГМ) в концентрациях 2 нг/мл и 10 нг/мл. Совместное воздействие rmTNF и VARV-CrmB приводило к восстановлению rmTNF-индуцированного снижения количества эритроидных колоний (БОЕ-Э+КОЕ-Э) и rmTNF-индуцированного повышения численности КОЕ-ГМ до исходного уровня. Полученные результаты демонстрируют TNF-блокирующую активность белка VARV-CrmB.

Ключевые слова: эритроидные предшественники, гранулоцитарно-макрофагальные предшественники, TNF, TNF-связывающий белок.

Toporkova L.B., Petuhova A.A., Gileva I.P., Orlovskaya I.A.

RECOMBINANT PROTEIN OF VARIOLA VIRUS ABOLISHES THE EFFECTS OF TUMOR NECROSIS FACTOR UPON MARROW HEMATOPOIESIS IN BALB/C MICE

Abstract. We studied the effect of a recombinant murine TNF (rmTNF) and TNF-binding protein of *Variola* virus (VARV-CrmB) upon colony-forming ability of bone marrow cells (BMC) from Balb/c mice. BMC were grown in semisolid methylcellulose medium supplemented with murine growth factors in the absence or presence of rmTNF along at concentrations ranging from 2 to 40 ng/ml, VARV-CrmB (2 to 24 ng/ml), as well as in presence of both rmTNF (2 ng/ml) and VARV-CrmB (2 to 12 ng/ml). Hematopoietic colonies (BFU-E, CFU-E, and CFU-GM) were scored on day 14. VARV-CrmB protein didn't influence clonogenicity of the bone marrow progenitors. rmTNF inhibited growth of erythroid cells (BFU-E+CFU-E) at all concentrations tested, and stimulated growth of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) at concentrations of 2 ng/ml and 10 ng/ml. Combined effect of rmTNF and VARV-CrmB resulted into abolition of rmTNF-induced reduction of BFU-E+CFU-E formation and rmTNF-induced increase of CFU-GM number up to basic levels. These results clearly demonstrate the anti-TNF activity of recombinant viral VARV-CrmB protein. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 297-304)

Адрес для переписки:

Орловская Ирина Анатольевна
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,
НИИКИ СО РАМН.
Факс: (383)222-70-28.
E-mail: irorl@mail.ru

Keywords: erythroid precursors, granulocyte-macrophage precursors, TNF, TNF-binding protein.

Введение

Ключевую роль в развитии воспалительных и иммунных реакций организма человека играет фактор некроза опухолей (TNF). Гиперпродукция TNF приводит к развитию хронических воспалительных заболеваний, в том числе аутоиммунной природы, таких как ревматоидный артрит, болезнь Бехтерева, болезнь Крона, TNF в настоящее время рассматривается как основная мишень для разработки новых биомедицинских технологий лечения ревматоидного артрита и других воспалительных заболеваний: используются различные ингибиторы TNF на основе генно-инженерных продуктов, блокирующих биологическую активность этого цитокина, ингибиторы синтеза и процессинга TNF, а также препараты, предотвращающие взаимодействие цитокина с эффекторными клетками [17]. Среди последних можно выделить препараты, действующим началом которых являются моноклональные антитела (Infliximab, Adalimumab) [19, 30, 33] или рекомбинантные химерные белки, состоящие из TNF-рецепторных и иммуноглобулиновых доменов (Etanercept) [24, 8]. Несмотря на то, что некоторые TNF-блокаторы успешно прошли клинические испытания и разрешены для применения в медицинской практике, имеется ряд противопоказаний для их применения: наличие у пациентов сердечно-сосудистых заболеваний [21], туберкулеза [13], латентных вирусных инфекций [11]. Кроме того, указанные препараты не являются универсальными. Например, Etanercept оказался эффективным при терапии ревматоидного артрита [29], но не септического шока [25]. В реальной клинической практике около 30-40% пациентов рефрактерны к терапии этими препаратами, менее чем у половины удается достигнуть полной или частичной ремиссии, а около 1/3 вынуждены прекращать лечение из-за развития вторичной неэффективности или побочных эффектов через 2-3 года терапии. Следовательно, существует необходимость создания препаратов нового типа, более безопасных и эффективно блокирующих

активность TNF. В процессе эволюции вируса натуральной оспы (ВНО) освоил эффективные механизмы преодоления иммунологического барьера человека. В частности, вирусный геном детерминирует синтез секретируемых белков, имеющих структурное сходство с клеточными рецепторами цитокинов. Вирусные белки функционируют как связывающие цитокины рецепторы, блокируя, таким образом, их активность [23, 7]. Способность вирусных белков взаимодействовать с иммунной системой человека открывает перспективы их использования для разработки иммунокорректирующих терапевтических средств. Новый тип TNF-антагониста разрабатывается на основе рекомбинантного TNF-связывающего белка ВНО (VARV-CrmB) [1]. В настоящее время установлено, что, помимо эффективной TNF-нейтрализующей активности *in vitro* [2, 3, 4], VARV-CrmB предупреждает изменения, сопровождающие картину развития экспериментального эндотоксического шока, индуцированного введением бактериальных липополисахаридов мышам линии Balb/c, достоверно увеличивая процент выживших животных [5, 16].

Хронические воспалительные процессы (в т.ч. ревматоидный артрит) часто сопровождаются формированием анемии. В основе патогенеза анемии хронических заболеваний лежат TNF-опосредованные нарушения пролиферации и усиление апоптоза эритроидных предшественников; доказано, что использование анти-TNF антител в лечении анемии при ревматоидном артрите приводит к значительному повышению уровня гемоглобина [26].

Целью настоящего исследования является изучение TNF-нейтрализующего потенциала рекомбинантного белка VARV-CrmB на модели костномозгового гемопоэза мышей Balb/c.

Материалы и методы

В работе использовался рекомбинантный мышинный TNF, выделенный из бактериального штамма-продуцента (1,5 мг/мл, 3×10^7 ME). Выде-

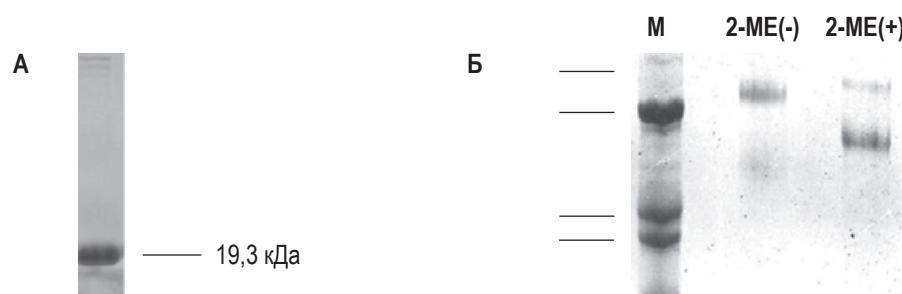


Рисунок 1. Электорофореграммы рекомбинантных белков mTNF (А) и VARV-CrmB (Б), используемых в исследовании

Примечание. М – маркеры молекулярных масс 97,0; 66,0; 45,0; 36,0 и 29,0 кДа (Sigma, США); 2-ME(-) и 2-ME(+) – отсутствие или присутствие 2-меркаптоэтанола (2-ME) в образцах VARV-CrmB.

ление рекомбинантного VARV-CrmB [0,2 мг/мл] проводили по методу, описанному в работе [6]. Определение концентрации белков проводили по методу [9]. Электрофореграммы рекомбинантных белков представлены на рисунке 1 А, Б.

Работа выполнена на 3-месячных мышах-самцах линии Balb/c. Для определения количества коммитированных предшественников клетки костного мозга (ККМ), взятые из бедренной кости, в концентрации 25×10^3 /мл инкубировали в трехкратных повторях в 24-луночных планшетах NUNC в метилцеллюлозной среде Metho Cult GF M 3434 (Stem Cell Technology, Canada), содержащей rhSCF, rhGM-CSF, rhIL-3, rhEpo. В метилцеллюлозную культуру с ККМ rmTNF добавлялся в концентрациях 2, 10, 20 и 40 нг/мл. TNF-связывающий белок VARV-CrmB использовался в концентрациях 2, 6, 12 и 24 нг/мл. Гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГМ) и эритроидные (бурстообразующие единицы эритроидные, БОЕ-Э; колониеобразующие единицы эритроидные, КОЕ-Э) колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом после 14-дневной инкубации при температуре 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета статистических программ

«STATISTICA 6.0». Достоверность межгрупповых различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Все данные представлены в работе как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Результаты

Для оценки дифференцировочных процессов в костном мозге мышей исследовалась колониеобразующая способность коммитированных гемопоэтических предшественников в метилцеллюлозной культуре ККМ (КОЕк).

Исследование влияния VARV-CrmB в различных концентрациях на колониеобразующую активность ККМ мышей. В первой серии экспериментов мы оценивали количество эритроидных и гранулоцитарно-макрофагальных предшественников при внесении рекомбинантного мышинового белка-антагониста TNF (VARV-CrmB) в различных концентрациях в метилцеллюлозную культуру ККМ. Было обнаружено, что VARV-CrmB в отсутствие gmTNF не оказывает эффекта на костномозговую гемопоэз (количество эритроидных и гранулоцитарно-макрофагальных колоний под воздействием VARV-CrmB достоверно не изменялось), что можно интерпретировать как отсутствие токсического эффекта изучаемого белка на гемопоэтические предшественники (рис. 2).

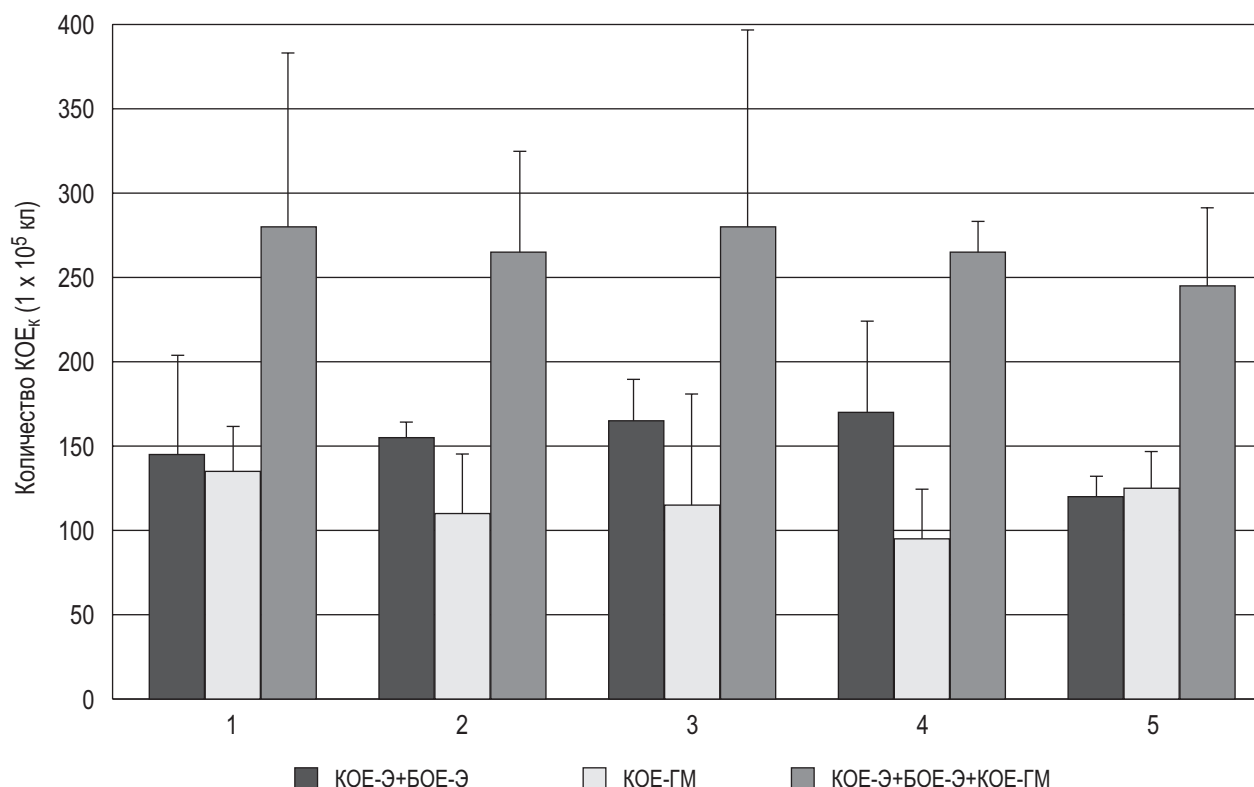


Рисунок 2. Влияние VARV-CrmB на колониеобразующую активность ККМ мышей Balb/c

Примечание. 1: контроль, 2-5: 2 нг/мл, 6 нг/мл, 12 нг/мл и 24 нг/мл VARV-CrmB, соответственно.

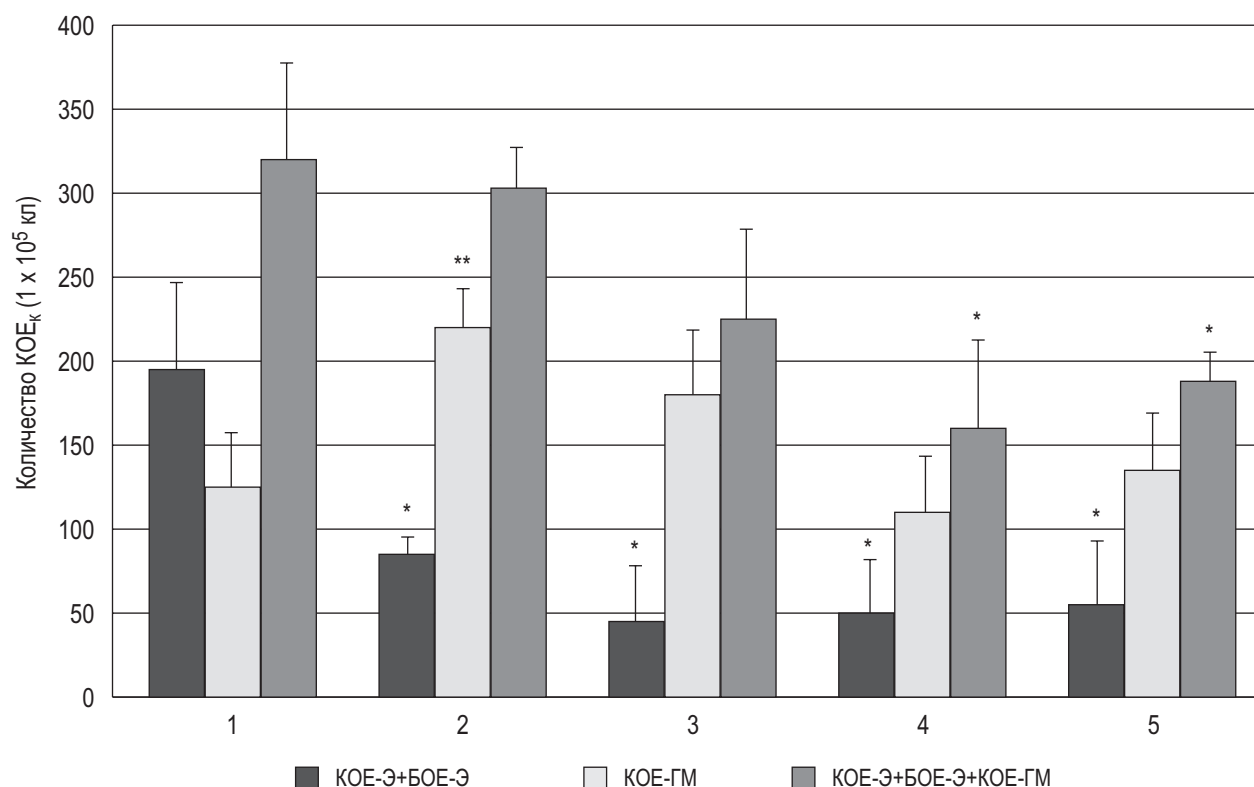


Рисунок 3. Влияние gTNF на колониобразующую активность ККМ мышей Balb/c

Примечание. 1: контроль; 2-5: 2 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 40 нг/мл gTNF, соответственно. * – достоверное снижение относительно контроля ($p < 0,05$); ** – достоверное повышение относительно контроля ($p < 0,05$).

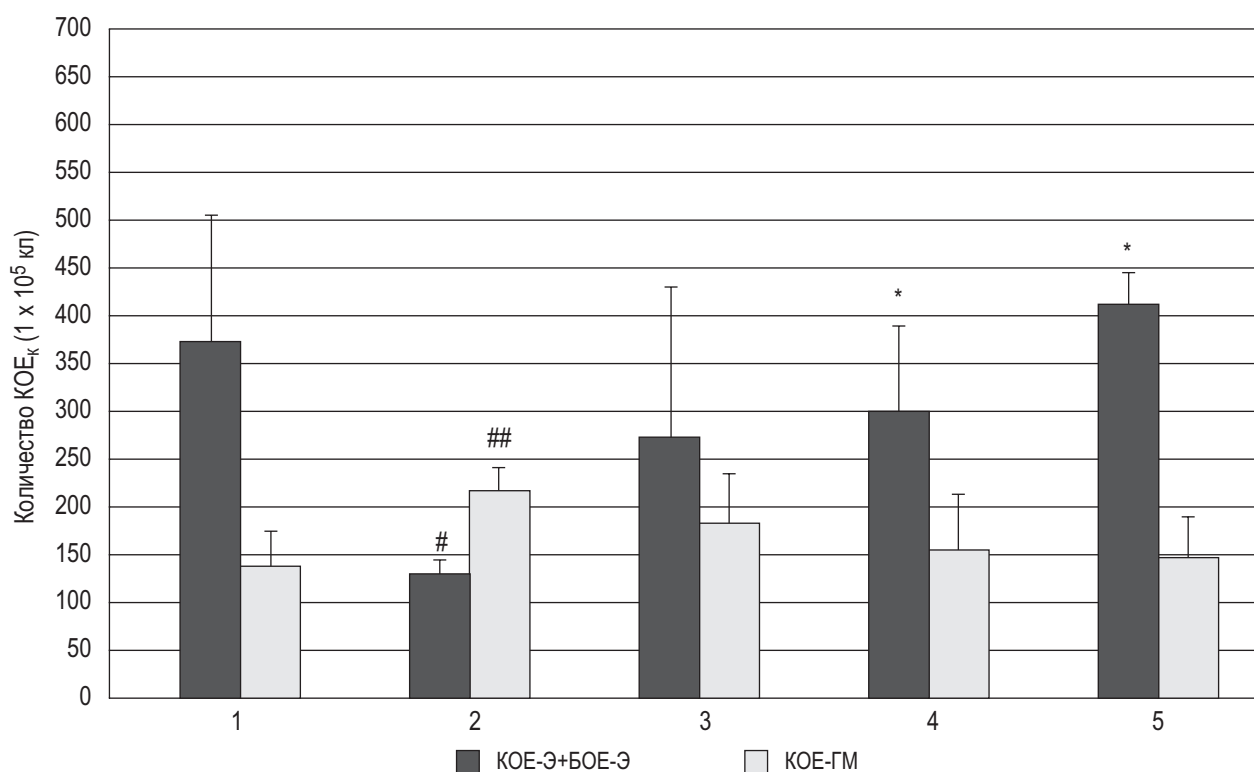


Рисунок 4. Влияние VARV-CrmB на gTNF-индуцированные изменения колониобразующей активности ККМ

Примечание. 1: контроль; 2: 2 нг/мл gTNF; 3-5: 2 нг/мл gTNF+2 нг/мл, 6 нг/мл и 12 нг/мл VARV-CrmB, соответственно. # – достоверное снижение относительно контроля ($p < 0,05$); ## – достоверное повышение относительно контроля ($p < 0,05$); * – достоверное повышение относительно 2 нг/мл gTNF ($p < 0,05$).

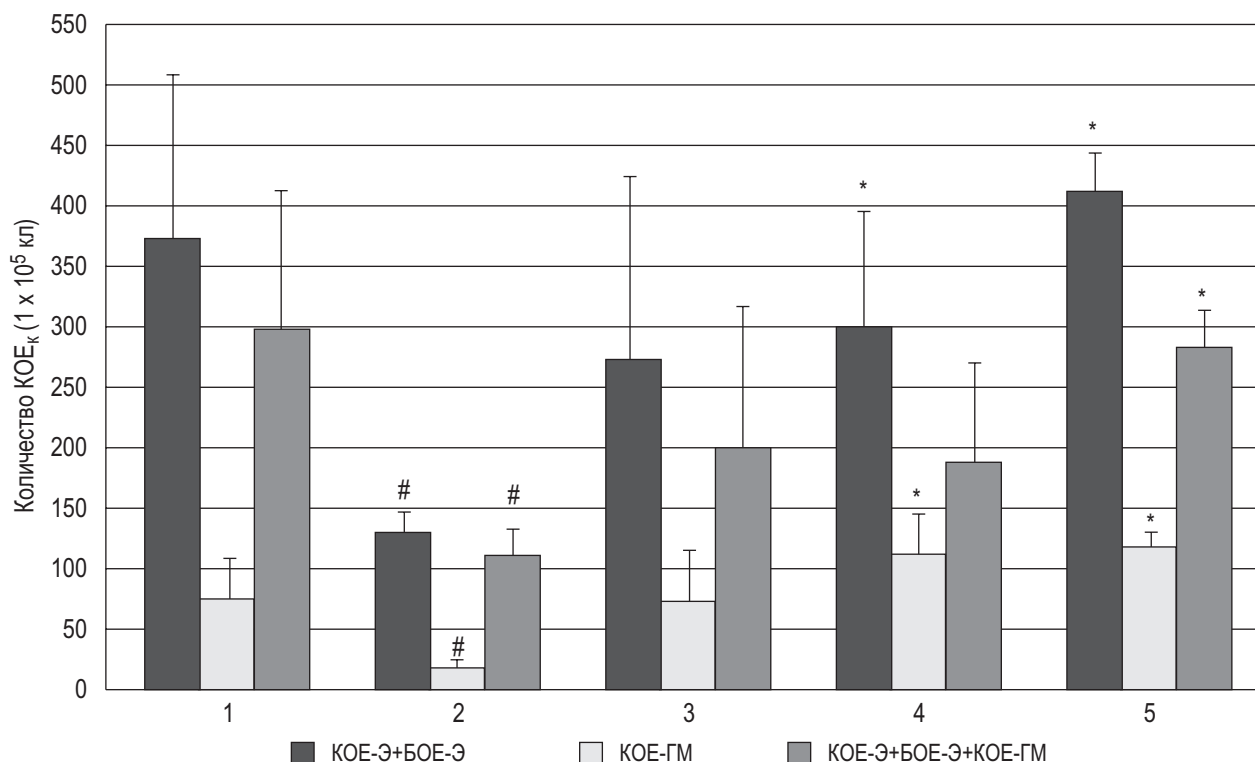


Рисунок 5. Влияние VARV-CrmB на колониобразующую активность ранних (БОЕ-Э) и поздних (КОЕ-Э) эритроидных предшественников в условиях воздействия gmTNF

Примечание. 1: контроль; 2: 2 нг/мл gmTNF; 3-5: 2 нг/мл gmTNF + 2 нг/мл, 6 нг/мл и 12 нг/мл VARV-CrmB, соответственно. # – достоверное снижение относительно контроля ($p < 0,05$); * – достоверное повышение относительно 2 нг/мл gmTNF ($p < 0,05$).

Исследование влияния gmTNF в различных концентрациях на колониобразующую активность ККМ мышей. Данные по влиянию рекомбинантного мышиногo gmTNF на колониобразующую активность гемопоэтических предшественников в метилцеллюлозной культуре представлены на рисунке 3. Из рисунка видно, что внесение gmTNF в различных концентрациях в культуру ККМ мышей приводило к достоверному снижению количества эритроидных предшественников (БОЕ-Э+КОЕ-Э). Вместе с тем мы наблюдали увеличение числа КОЕ-ГМ по сравнению с контролем (культуральная среда) при воздействии gmTNF в концентрациях 2 нг/мл (достоверное) и 10 нг/мл (недостоверное). При воздействии gmTNF в концентрациях 20 и 40 нг/мл не наблюдалось изменений ГМ-колониобразования, что сказывалось на общем количестве КОЕк: этот показатель был достоверно снижен.

Для исследования влияния VARV-CrmB на gmTNF-индуцированные изменения констномозгового гемопоэза была выбрана концентрация gmTNF 2 нг/мл.

Влияние рекомбинантного мышиногo белка-антагониста (VARV-CrmB) на gmTNF-индуцированные изменения колониобразующей активности ККМ. В дальнейших экспериментах мы исследовали влияние ре-

комбинантного мышиногo белка-антагониста TNF (VARV-CrmB) в различных концентрациях на gmTNF-индуцированные изменения колониобразующей активности ККМ (рис. 4). Следствием воздействия gmTNF (2 нг/мл) в данной серии экспериментов было достоверное снижение количества эритроидных колоний (БОЕ-Э+КОЕ-Э) и достоверное повышение количества КОЕ-ГМ по сравнению с контролем. Воздействие VARV-CrmB приводило к дозозависимому усилению эритроидного колониобразования (достоверному при добавлении VARV-CrmB в концентрациях 6 и 12 нг/мл). В то же время блокада gmTNF с помощью VARV-CrmB вызывала недостоверное снижение колониобразующей активности гранулоцитарно-макрофагальных предшественников.

Эритроидные колонии, выявляемые в метилцеллюлозной культуре, гетерогенны и состоят из ранних (БОЕ-Э) и поздних (КОЕ-Э) колоний, морфологически различающихся. Анализ структуры эритроидных колоний, выявленных в предыдущем эксперименте, показал (рис. 5), что восстановление количества эритроидных колоний под воздействием VARV-CrmB на фоне ингибиторного эффекта gmTNF происходит в том числе за счет увеличения численности поздних (КОЕ-Э) эритроидных предшественников, что

может свидетельствовать о влиянии VARV-CrmB на процесс созревания эритроидных клеток.

Обсуждение

Хронические воспалительные процессы часто сопровождаются формированием анемии. Увеличение продукции TNF в костном мозге приводит к анемии у пациентов с ревматоидным артритом и ассоциируется с апоптотическим истощением эритроидных предшественников. Известно, что в TNF-зависимое подавление эритропоэза вовлекается фактор транскрипции NF- κ B, который репрессирует α - и ζ - глобиновые промоторы в ранних эритроидных предшественниках [20]. Показано снижение колониеобразующей активности эритроидных предшественников (БОЕ-Э) в костном мозге больных ревматоидным артритом. Эти изменения могут быть скорректированы с помощью препаратов, блокирующих активность TNF: внесение анти-TNF антител в культуру моноклеарных клеток больных ревматоидным артритом приводит к увеличению количества БОЕ-Э. Кроме того, доказано, что использование анти-TNF антител в лечении анемии при ревматоидном артрите приводит к значительному повышению уровня гемоглобина [26]. Эти данные открывают перспективу использования блокаторов TNF для лечения анемии хронических заболеваний.

Новый тип TNF-антагониста разрабатывается на основе рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы [1]. В настоящее время установлено, что, помимо эффективной TNF-нейтрализующей активности *in vitro* [2, 3, 4], VARV-CrmB предупреждает изменения, сопровождающие картину развития экспериментального эндотоксического шока, достоверно увеличивает процент выживших животных [5, 16]. TNF-блокирующие свойства VARV-CrmB исследовались *in vitro* на модели костномозгового гемопоэза мышей при воздействии gmTNF. В данной работе мы продемонстрировали, что VARV-CrmB не оказывает токсического эффекта в отношении гемопоэтических предшественников: внесение белка в метилцеллюлозную культуру клеток костного мозга в отсутствие gmTNF не приводило к изменению их колониеобразующей способности (рис. 2).

Мы исследовали влияние gmTNF на колониеобразующую способность гемопоэтических предшественников. Нами показано, что gmTNF оказывает ингибирующий эффект на эритроидное колониеобразование. Ранее было продемонстрировано снижение количества эритроидных колоний под влиянием TNF *in vitro* [28]; цитокин также ингибировал эритроидное колониеобразование (БОЕ-Э и КОЕ-Э) различными клеточными линиями (K562, HL60, HEL) [27]. Показан

супрессивный эффект TNF на пролиферативную активность гликофорин-положительных (GPA⁺) эритроидных клеток [34]. Однако при введении TNF *in vivo*, наряду с ингибацией поздних стадий эритропоэза (КОЕ-Э) и ретикулоцитов периферической крови, была обнаружена стимуляция ранних эритроидных предшественников (БОЕ-Э) [18].

Воздействие VARV-CrmB на фоне ингибиторного эффекта gmTNF приводило к дозозависимому усилению эритроидного колониеобразования (рис. 4). Восстановление количества эритроидных колоний под влиянием VARV-CrmB происходило в том числе за счет увеличения численности поздних (КОЕ-Э) эритроидных предшественников (рис. 5), что может свидетельствовать о влиянии VARV-CrmB на процесс созревания эритроидных клеток. Очевидно, что блокада gmTNF с помощью VARV-CrmB, подобно эффекту анти-TNF антител, отменяет ингибиторный эффект gmTNF на предшественники эритропоэза.

Наряду со стимуляцией эритроидной дифференцировки, мы обнаружили увеличение количества КОЕ-ГМ под влиянием gmTNF в малых концентрациях (достоверное при использовании gmTNF в концентрации 2 нг/мл) по сравнению с контролем (рис. 3). В работе Rusten с соавторами [28] также показан стимулирующий эффект TNF в концентрации 2 нг на рост гранулоцитарно-макрофагальных колоний, в то время как эритроидная дифференцировка была подавлена. Опубликованы данные об увеличении гранулоцитарно-макрофагального компартмента под влиянием TNF при введении его *in vivo* [32, 18]. Показано, что под влиянием TNF *in vitro* ингибируется эритропоэз (КОЕ-Э и GPA⁺ клетки), но стимулируется незритроидное колониеобразование (гликофорин-отрицательные, GPA⁻ клетки). GPA⁻ клетки имеют фенотип дендритных клеток (CD11c⁺), они способны взаимодействовать с незрелыми эритроидными клетками, разрушая их [15]. В синергизме с SCF и IL-7 TNF значительно стимулирует образование макрофагальных колоний [14].

Тем не менее в отношении пролиферации и дифференцировки миелоидных клеток TNF может оказывать как позитивный, так и негативный эффект, в зависимости от условий эксперимента. Исследование влияния TNF на колониеобразующую активность гемопоэтических предшественников периферической крови человека показало снижение количества КОЕ-ГМ, наряду с ингибацией численности эритроидных колоний (БОЕ-Э) [31]. В работе Broxmeyer с соавторами [10] также показано дозозависимое подавление колониеобразования (КОЕ-ГМ,

БОЕ-Э, КОЕ-Э, КОЕ-ГЭММ) под влиянием TNF. На культуре клеток пуповинной крови человека продемонстрирован, наряду со стимуляцией пролиферации ранних гемопоэтических предшественников (CD34⁺), ингибиторный эффект TNF на пролиферацию и дифференцировку гранулоцитарных предшественников; этот ингибиторный эффект TNF полностью отменялся внесением в культуру клеток антител против TNF [12]. Таким образом, TNF рассматривается как позитивный и негативный регулятор гемопоэза.

В данных экспериментальных условиях мы продемонстрировали достоверное увеличение количества КОЕ-ГМ под влиянием gmTNF в концентрации 2 нг/мл; блокада gmTNF с помощью VARV-CrmB приводила к недостоверному снижению ГМ-колониобразования (рис. 4).

Таким образом, gmTNF-блокирующие свойства рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы (VARV-CrmB) продемонстрированы на модели костномозгового гемопоэза: VARV-CrmB оказывает корректирующие эффекты в отношении gmTNF-зависимых изменений колониобразующей активности гемопоэтических предшественников.

Работа поддержана Федеральной Целевой Программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 (Государственный контракт 02.740.11.0485). Поддержана грантом РФФИ 10-04-00387-а

Список литературы

1. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Максюттов З.А., Тотменин А.В., Агеенко В.А., Нестеров А.Е., Щелкунов С.Н. Рекомбинантная плазмидная ДНК pFastBac-G2R, содержащая фрагмент генома вируса натуральной оспы, кодирующий белок-аналог рецептора TNF, и штамм бакуловируса BVi67, продуцирующий растворимый рецептор TNF вируса натуральной оспы // Рос. патент № 2241754. — 2003.
2. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Максюттов З.А., Тотменин А.В., Лебедев Л.Р., Нестеров А.Е., Агеенко В.А., Щелкунов С.Н., Сандахчиев Л.С. Сравнительное изучение свойств ортопоксвирусных растворимых рецепторов фактора некроза опухолей // Доклады РАН. — 2003. — Т. 390. — С. 160-164.
3. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Непомнящих Т.С., Тотменин А.В., Максюттов З.А., Лебедев Л.Р., Афиногенова Г.Н., Пустошилова Н.М., Щелкунов С.Н. Экспрессия генов TNF-связывающих белков ортопоксвирусов в клетках насекомых и изучение свойств рекомбинантных белков // Молекулярная биология. — 2005. — Т. 39. — С. 1.
4. Гилева И.П., Непомнящих Т.С., Рязанкин И.А., Щелкунов С.Н. Рекомбинантный TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы как потенциальный TNF-антагонист нового поколения // Биохимия. — 2009. — Т. 74. — С. 1664-1671.
5. Гилева И.П., Малкова Е.М., Непомнящих Т.С., Виноградов И.В., Лебедев Л.Р., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Рябчикова Е.И., Щелкунов С.Н. Изучение действия TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы на развитие ЛПС-индуцированного эндотоксического шока // Цитокины и воспаление. — 2006. — Т. 5. — С. 44-48.
6. Лебедев Л.Р., Рязанкин И.А., Сизов А.А., Агеенко В.А., Одегов В.Н., Афиногенова Г.Н., Щелкунов С.Н. Способ очистки антагонистов фактора некроза опухолей и исследование их некоторых свойств // Биотехнология. — 2001. — № 6. — С. 14-18.
7. Щелкунов С.Н. Иммуномодуляторные белки ортопоксвирусов // Молекулярная биология. — 2003. — Т. 37. — С. 41-53.
8. Bathon J.M., Martin R.W., Fleischmann R.M., Tesser J.R., Schiff M.H., Keystone E.C., Genovese M.C., Wasko M.C., Moreland L.W., Weaver A.L., Harkenson J., Fink B.K. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis // N. Engl. J. Med. — 2000. — Vol. 343. — P. 1586-1593.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248-254.
10. Broxmeyer H.E., Williams D.E., Lu L., Cooper S., Anderson S.L., Beyer G.S., Hoffman R., Rubin B.Y. The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon-gamma // J. Immunol. — 1986. — Vol. 136. — P. 4487-4495.
11. Calabrese L.H., Zein N., Vassilipoulos D. Safety of antitumor necrosis factor (anti-TNF) therapy in patients with chronic viral infections: hepatitis C, hepatitis B, and HIV infection // Ann. Rheum. Dis. — 2004. — Vol. 63 (suppl. 2). — P. 18-24.
12. Caux C., Favre C., Saeland S., Duvert V., Durand I., Mannoni P., Banchereau J. Potentiation of early hematopoiesis by Tumor Necrosis Factor- α is followed by inhibition of granulopoietic differentiation and proliferation // Blood. — 1991. — Vol. 78. — P. 635-644.
13. Drugs for rheumatoid arthritis // Treatment Guideline the Medical Letter. — 2005. — Vol. 3. — P. 83-90.
14. Fahlman C., Jacobsen F.W., Veiby O.P., McNiece I.K., Blomhoff H.K., Jacobsen S.E.W. Tumor Necrosis Factor potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine

hematopoietic progenitor cells in combination with Stem Cell Factor and Interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptor // *Blood*. — 1994. — Vol. 84. — P. 1528-1533.

15. Fukaya H., Xiao W., Inaba K., Suzuki Y., Hirokawa M., Kawabata Y., Komatsuda A., Endo T., Kishimoto H., Takada G., Sawada K. Codevelopment of dendritic cells along with erythroid differentiation from human CD34⁺ cells by tumor necrosis factor- α // *Exp. Hematol.* — 2004. — Vol. 32. — P. 450-460.

16. Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.V., Shchelkunov S.N. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different // *BBA – Proteins and Proteomics*. — 2006. — Vol. 1764, N. 11. — P. 1710-1718.

17. Hasegawa A., Takasaki W., Greene M.I., Murali R. Modifying TNF α for therapeutic use: A perspective on the TNF receptor system // *Mini. Rev. Med. Chem.* — 2001. — Vol. 1. — P. 5-16.

18. Johnson C. S., Chang M.-J., Furmanski P. In Vivo Hematopoietic Effects of Tumor Necrosis Factor- α in Normal and Erythroleukemic Mice: Characterization and Therapeutic Applications // *Blood*. — 1988. — Vol. 72. — P. 1875-1883.

19. Knight D.M., Trinh H., Le J., Siegel S., Shealy D., McDonough M., Scallan B., Moore M.A., Vilcek J., Daddona P., Ghraieb J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody // *Mol. Immunol.* — 1993. — Vol. 30. — P. 1443-1453.

20. Liu J.J., Hou S.C., Shen C.K. Erythroid gene suppression by NF-kappa B // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278. — P. 19534-19540.

21. Lo E., Rezaik K., Evans A.T., Madariaga M.G., Phillips M., Brobbey W., Schwartz D.N., Wang Y., Weinstein R.A., Trenholm G.M. Why don't they listen? Adherence to recommendations of infectious diseases consultations // *Clin. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 40. — P. 636-637.

22. Mc Devitt H., Munson S., Ettingen R., Wu A. Multiple roles for tumor necrosis factor- α and lymphotoxin α/β in immunity and autoimmunity // *Arthritis Res.* — 2002. — Vol. 4 (supp.).

23. McFadden G., Murphy P.M. Host-related immunomodulators encoded by poxviruses and herpesviruses // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 3. — P. 371-373.

24. Mohler K.M., Torrance D.C., Smith C.A., Goodwin R.G., Stremler K.E., Fung V.P., Madani H., Widmer M.B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists // *J. Immunol.* — 1993. — Vol. 151. — P. 1548-1561.

25. Moreland L.W., Baumgartner S.W., Schiff M.H., Tindall E.A., Fleischmann R.M., Weaver A.I., Ettinger R.E., Cohen S., Koopman W.J., Mohler K., Widmer M.B., Bloesch C.M. Treatment of

rheumatoid arthritis with recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — Vol. 337. — P. 141-147.

26. Papadaki H., Kritikos H., Valatas V., Boumpas D., Eliopoulos G. Anemia of chronic diseases in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor- α antibody therapy // *Blood*. — 2002. — Vol. 100. — P. 474-482.

27. Roodman G., Bird A., Hutzler D., Montgomery W. Tumor necrosis factor- α and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells // *Exp Hematol.* — 1987. — Vol. 15. — P. 928-935.

28. Rusten L.S., Jacobsen S.E. Tumor necrosis factor (TNF)- α directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors // *Blood*. — 1995. — Vol. 85. — P. 989-996.

29. Scallan B.J., Trinh T., Nedelman M., Brennan F.M., Feldmann M., Ghraieb J. Functional comparisons of different tumor necrosis factor receptor/IgG fusion proteins // *Cytokine*. — 1995. — Vol. 7. — P. 759-770.

30. Siegel S.A., Shealy D.J., Nakada M.T., Le J., Woulfe D.S., Probert L., Kollias G., Ghraieb J., Vilcek J., Daddona P.E. The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo // *Cytokine*. — 1995. — Vol. 7. — P. 15-25.

31. Skobin V., Jelkmann W., Morschakova E., Pavlov A.D., Schlenke P. Tumor necrosis factor- α and TNF- β inhibit clonogenicity of mobilized human hematopoietic progenitors // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2000. — Vol. 20. — P. 507-510.

32. Urbaschek R., Mannel D.N., Urbaschek B. Tumor necrosis factor induced stimulation of granulopoiesis and radioprotection // *Lymphokine Res.* — 1987. — Vol. 6. — P. 179-186.

33. Weinblatt M.E., Keystone E.C., Furst D.E., Moreland L.W., Weisman M.H., Bizbara C.A., Teoh L.A., Fischhoff S.A., Chartash E.K. Adalimumab. A fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial // *Arthritis and Rheumatism* — 2003. — Vol. 48. — P. 35-45.

34. Xiao W., Koizumi K., Nishio M., Endo T., Osawa M., Fujimoto K., Sato I., Sakai T., Koike T., Sawada K. Tumor necrosis factor- α inhibits generation of glycophorin A⁺ cells by CD34⁺ cells. // *Exp. Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 1238-1247.

поступила в редакцию 27.01.2010

отправлена на доработку 15.02.2010

принята к печати 27.02.2010