

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ, СВЯЗЫВАЮЩЕГО ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ

Орловская И.А.<sup>1</sup>, Цырендоржиев Д.Д.<sup>1</sup>, Топоркова Л.Б.<sup>1</sup>,  
Курилин В.В.<sup>1</sup>, Лопатникова Ю.А.<sup>1</sup>, Вязовая Е. А.<sup>1</sup>,  
Гилева И.П.<sup>2</sup>, Щелкунов С.Н.<sup>2</sup>, Сенников С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область

**Резюме.** В настоящем обзоре собственных экспериментальных данных приведены результаты изучения *in vivo* и *in vitro* эффектов TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы (VARV-CrmB) на TNF-зависимые изменения функциональной активности мышинных и человеческих клеток. *In vitro* VARV-CrmB отменяет вызываемую TNF повышенную продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6 мононуклеарными клетками человека и их повышенную окислительно-метаболическую активность. Рекombинантный белок VARV-CrmB восстанавливает TNF-индуцированное снижение количества эритроидных колоний и оказывает корригирующие эффекты на колониеобразующую активность ГМ-предшественников мыши и человека. *In vivo* белок VARV-CrmB оказывает выраженный лечебный эффект на проявления LPS-индуцированного эндотоксического шока у SPF мышей Balb/C, достоверно увеличивая процент выживших животных. Белок VARV-CrmB уменьшает выраженность коллаген-индуцированного артрита на ранних сроках его формирования. Аппликативное воздействие белка VARV-CrmB нормализует TNF-индуцированное повышение миграционной и окислительно-метаболической активности лейкоцитов мышей и оказывает корригирующие эффекты на колониеобразующую активность гемопоэтических предшественников. Аппликативное воздействие VARV-CrmB снижает миграцию лейкоцитов из кожного лоскута в афферентной фазе контактной реакции на ДНХБ и показатель «отека уха» в эфферентной фазе контактной реакции на ДНХБ. Полученные результаты демонстрируют TNF-блокирующие свойства белка VARV-CrmB. Совокупность полученных нами данных позволяет рассматривать рекомбинантный вирусный белок VARV-CrmB как новый потенциальный TNF-антагонист, эффекты которого могут быть реализованы за счет его нейтрализующей способности TNF-индуцированной активации окислительно-метаболической, цитокин-продуцирующей и миграционной функций эффекторных клеток при терапии патологических воспалительных процессов.

**Ключевые слова:** TNF, TNF-связывающий белок, контактный дерматит, коллаген-индуцированный артрит.

Orlovskaya I.A., Tsyrendorzhiev D.D., Toporkova L.B., Kurilin V.V., Lopatnikova Y.A., Vyazovaya E.A., Gileva I.P., Schelkunov S.N., Sennikov S.V.

## Адрес для переписки:

Орловская Ирина Анатольевна,  
НИИКИ СО РАМН  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: (913) 748-60-99.  
E-mail: irorl@mail.ru

## BIOLOGICAL EFFECTS OF TNF-BINDING VARIOLAVIRUS RECOMBINANT PROTEIN

**Abstract.** This review presents a summary of our data concerning *in vivo* and *in vitro* effects of recombinant TNF-binding protein from variola virus (VARV-CrmB) upon TNF-induced functional changes of

human and murine cells. VARV-CrmB protein blocks TNF-induced production of IL-1 $\beta$  and IL-6 by human mononuclear cells, and their *in vitro* oxidation-related metabolic (OM) activity. VARV-CrmB protein restores TNF-induced reduction of BFU-E+CFU-E colony-forming activity and normalizes TNF-induced effects upon CFU-GM formation in a colony-forming model of human and murine bone marrow cells (BMC). VARV-CrmB protein displays a pronounced *in vivo* alleviation of LPS-induced endotoxic shock symptoms in SPF BALB/C mice thus significantly increasing survival of experimental animals. Moreover, VARV-CrmB protein decreases intensity of collagen-induced arthritis at early terms. Application of VARV-CrmB protein results in normalization of TNF-induced increase of migratory and OM activity of murine leukocytes, and exerts corrective effects upon colony-forming ability of murine hematopoietic precursors. Skin application of VARV-CrmB protein decreases leukocyte migration from a skin scrap in afferent phase of DNCB-induced contact reaction, as well as "ear oedema" index. Our results demonstrate TNF-blocking properties of VARV-CrmB protein. In summary, our data allow to consider a recombinant variola virus VARV-CrmB as a new potential TNF-antagonist. Its effects can be explained by its ability of neutralizing TNF-induced activation of oxidation-related metabolic, cytokine-producing and migratory functions of effector cells in therapy of pathological inflammatory processes. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 33-42)

**Keywords:** TNF, TNF-binding protein, contact dermatitis, collagen-induced arthritis.

## Введение

Особое внимание в развитии воспалительного процесса придается провоспалительным свойствам фактора некроза опухолей (TNF), которые имеют фундаментальное значение в патогенезе многих воспалительных заболеваний. Гиперпродукция TNF приводит к развитию хронических воспалительных заболеваний, в том числе аутоиммунной природы, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, псориаз, атопический дерматит и многие другие. Наиболее веские доказательства патогенетического значения TNF получены при ревматоидном артрите. Согласно современным представлениям, именно цитотоксическими эффектами TNF обусловлены основные проявления заболевания: хронический синовит, деструктивные поражения хряща и кости. Под действием TNF повышается функциональная активность нейтрофилов, в том числе мигрировавших в сустав с образованием активных форм кислорода и высвобождением лизосомальных ферментов, которые оказывают повреждающее действие на хрящевую и костную ткань.

В связи с этим, TNF в настоящее время рассматривается как основная мишень для разработки новых биомедицинских технологий лечения ревматоидного артрита и других воспалительных заболеваний. В качестве подходов к антицитокиновой стратегии лечения этих заболеваний используют различные ингибиторы TNF на основе генно-инженерных продуктов. Используются или проходят апробацию антитела против TNF, растворимые рецепторы к TNF, аптамеры [17].

Эти подходы имеют свои достоинства и недостатки [19, 22, 26]. Необходимость расшире-

ния спектра анти-TNF препаратов обусловлена тем, что различные анти-TNF препараты обладают разной терапевтической эффективностью, обусловленной особенностями их биологических активностей: Etanercept – единственный из анти-TNF препаратов, способный связывать и нейтрализовывать лимфотоксин; Infliximab и Adalimumab, в отличие от Etanercept, способен фиксировать комплемент и, следовательно, приводить к лизису клеток, экспрессирующих мембраносвязанный TNF и т.д. Также следует отметить, что многие пациенты, страдающие ревматоидным артритом (или другим воспалительным/аутоиммунным заболеванием), оказываются чувствительными к одному анти-TNF препарату, но не к другим. Кроме того, в связи с иммуногенностью анти-TNF препаратов эффективность терапии может снижаться. При потере чувствительности к какому-либо анти-TNF препарату его можно заменить другим – есть сообщение, что применение Adalimumab у пациентов, потерявших чувствительность к Infliximab или Etanercept, оказывается эффективным. Хотя известные в настоящее время ингибиторы TNF продемонстрировали относительно высокую эффективность в процессе контролируемых исследований терапии ревматоидного артрита [15, 20], в реальной клинической практике около 30-40% пациентов рефрактерны к терапии этими препаратами, менее чем у половины из них 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. Лечение известными в настоящее время ингибиторами TNF может сопровождаться развитием инфекционных осложнений, в первую

очередь туберкулезной инфекции. Длительное (3 года и более) лечение больных ревматоидным артритом моноклональными антителами к TNF (infliximab или adalimumab) вызывает также развитие псориаза у значительной части пациентов; причины и механизмы таких осложнений остаются невыясненными. Следовательно, существует необходимость создания препаратов нового типа, более безопасных и эффективно блокирующих активность TNF.

Известно, что ряд вирусов в ходе эволюции выработали специфические способы защиты от иммунной системы человека, заключающиеся в экспрессии вирусных белков, которые могут эффективно вмешиваться в иммунорегуляцию, блокируя биологическую активность некоторых иммунорегуляторов. В частности, ортопоксвирусы продуцируют белки, блокирующие активность TNF [12, 28]. В настоящее время эти вирусные белки рассматриваются как эффективный подход для разработки новых биомедицинских технологий защиты человека в качестве препаратов антицитокинового действия.

### **1. Физико-химические характеристики и сравнительная нейтрализующая активность TNF-блокирующего белка вируса натуральной оспы (VARV-CrmB)**

На базе ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» получены бакуловирусы, продуцирующие рекомбинантный белок vTNFR вируса натуральной оспы – VARV-CrmB [3, 4] и разработан метод выделения этого белка [7]. При изучении его физико-химических свойств оказалось, что VARV-CrmB при синтезе в клетках насекомых формирует олигомерные формы. При фракционировании афинновыделенного VARV-CrmB в SDS-ПААГ в нередуцирующих условиях он детектируется окрашиванием красителем Кумасси R250, в основном как полипептид с молекулярной массой около 90 кДа, а в редуцирующих условиях – как 47 кДа. Результаты определения TNF-нейтрализующей активности культуральной среды после разрушения замораживанием-оттаиванием клеток насекомых линии Sf21, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом, показали, что такая активность связана с фракциями, содержащими высокомолекулярные белки. По-видимому, олигомерные формы VARV-CrmB достаточно лабильны, и применяемый способ выделения рекомбинантного белка позволяет сохранять в основном его более стабильные димерные формы. Также показано, что в клетках насекомых синтезируемый вирусный белок эффективно гликозилируется, что может положительно влиять на его стабильность при потенциальном терапевтическом использовании. Результаты проведенного исследова-

ния свидетельствуют, что рекомбинантный вирусный белок VARV-CrmB нейтрализует *in vitro* цитотоксическое действие hTNF, hLT и MuTNF. Эффективность нейтрализации hTNF соизмерима с активностью химерных клеточных рецепторов и моноклонального антитела mAb MAK195 [2, 5, 16].

### **2. Исследование влияния VARV-CrmB на функциональную активность клеток**

#### **2.1. Влияние VARV-CrmB на TNF-стимулированную продукцию цитокинов (IL-1 и IL-6) мононуклеарными клетками (МНК) здоровых доноров**

Результаты исследования показали, что TNF в концентрации 2 нг/мл увеличивает продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6 в культуре МНК соответственно в 246,7 и 13,5 раза ( $p < 0,01$ ). Воздействие VARV-CrmB (100 нг/мл) увеличивало концентрации IL-1 $\beta$  и IL-6 соответственно в 2,8 раза ( $p < 0,05$ ) и 1,6 раза ( $p = 0,08$ ) по сравнению с контролем (спонтанная продукция). В концентрации 10 нг/мл VARV-CrmB не вызывал значимых изменений содержания цитокинов. Различия в содержании IL-1 $\beta$  в кондиционной среде культуры МНК при добавлении VARV-CrmB (100 нг/мл и 10 нг/мл) были достоверны.

ПолиAb<sub>TNF</sub> (1000 нг/мл, 100 нг/мл и 50 нг/мл) нейтрализовали TNF-индуцированную продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6; при максимальной концентрации антител уровень цитокинов был наименьшим.

Применение моноAb<sub>TNF</sub> в концентрации 100 нг/мл и 50 нг/мл не приводило к полной нейтрализации TNF-индуцированной продукции IL-1 $\beta$  и IL-6. При соинкубации моноAb<sub>TNF</sub> в концентрации 100 нг/мл с TNF содержание IL-1 $\beta$  и IL-6 в культуре МНК уменьшалось в 93,3 и 8,9 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. В концентрации 50 нг/мл моноAb<sub>TNF</sub> снижало TNF-индуцированную продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6 соответственно в 15,2 и 1,6 раза ( $p < 0,05$ ).

В результате предварительной совместной инкубации TNF и белка VARV-CrmB в различных концентрациях (100 нг/мл и 10 нг/мл) полностью отменялись эффекты TNF на продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6 в культуре МНК, а концентрации цитокинов снижались до уровня спонтанной продукции.

Следует отметить, что в концентрации 100 нг/мл эффекты моноAb<sub>TNF</sub>, полиAb<sub>TNF</sub> и белка VARV-CrmB на блокирование TNF-опосредованной продукции цитокинов в культуре МНК были сопоставимы и не имели достоверных различий. Наряду с этим только белок VARV-CrmB в более низкой концентрации (10 нг/мл) обладал полной нейтрализую-

щей активностью на эффекты TNF, в отличие от моноAb<sub>TNF</sub> и полиAb<sub>TNF</sub>.

Таким образом, белок VARV-CrmB обладает большей TNF-нейтрализующей способностью по сравнению с полиAb<sub>TNF</sub> и моноAb<sub>TNF</sub>.

## 2.2. Влияние VARV-CrmB на окислительно-метаболическую активность моноклеарных клеток

Регулирующее действие цитокинов при различных патологических состояниях, в том числе при воспалении, во многом реализуется через активацию наработки активных метаболитов кислорода (АМК). Известно, что TNF, взаимодействуя с клеточными рецепторами TNFR1 (p55) и TNFR2 (p75), модулирует окислительный метаболизм фагоцитирующих клеток [24]. Высокая реакционная способность АМК определяет их токсичность для биологических систем на всех уровнях — от молекулярно-клеточного до организменного. Например, гиперпродукция TNF и АМК при массивной антигенной нагрузке и/или на фоне дефицита антиоксидантов приводит к разрушению клеток и тканей [6].

Показано, что TNF (2 нг/мл) усиливает хемилюминесцентный (ХЛ) ответ МНК здоровых доноров в 2 раза ( $p < 0,01$ ). В то же время белок VARV-CrmB и полиAb<sub>TNF</sub> соответственно в концентрациях 8 нг/мл и 50 нг/мл не оказывают влияние на окислительно-метаболическую функцию МНК. При добавлении 8 нг/мл полиAb<sub>TNF</sub> TNF-индуцированный ХЛ ответ снижается в 1,35 раза. ПолиAb<sub>TNF</sub> в концентрации 50 нг/мл практически отменяют эффект TNF. VARV-CrmB (8 нг/мл), как и полиAb<sub>TNF</sub> (50 нг/мл) отменяют TNF-индуцированный ХЛ ответ МНК. Так, максимальное пиковое значение ХЛ ответа ( $I_{max}$ ) МНК крови доноров при действии TNF (2 нг/мл) в среднем составило  $2982,9 \pm 194,1$  имп/ $10^3$  МНК. При добавлении 8 нг/мл полиAb<sub>TNF</sub> значение  $I_{max}$  TNF-индуцированного ХЛ ответа МНК снизилось до  $1986,2 \pm 344,8$  имп/ $10^3$  МНК ( $p < 0,05$ ), а 50 нг/мл полиAb<sub>TNF</sub> — до  $1228,1 \pm 178,9$  имп/ $10^3$  МНК ( $p < 0,01$ ). При добавлении 8 нг/мл TNF-связывающего белка VARV-CrmB значение  $I_{max}$  TNF-индуцированного ХЛ ответа МНК снизилось до  $1129 \pm 347,4$  имп/ $10^3$  МНК ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, по результатам исследования окислительно-метаболической функции МНК, VARV-CrmB обладает большей TNF-нейтрализующей способностью по сравнению с полиAb<sub>TNF</sub> и моноAb<sub>TNF</sub>.

## 2.3. Влияние VARV-CrmB на колониюобразующую активность клеток костного мозга мыши и человека в условиях воздействия rTNF

Хронические воспалительные процессы часто сопровождаются формированием анемии.

В основе патогенеза анемии хронических заболеваний лежат TNF-опосредованные нарушения пролиферации и усиление апоптоза эритроидных предшественников; показано снижение колониюобразующей 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 [25]. Для оценки дифференцировочных процессов в костном мозге мыши и человека исследовалась колониюобразующая способность коммитированных гемопоэтических предшественников в метицеллюлозной культуре 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. 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. Совместное воздействие gmTNF и VARV-CrmB приводит к восстановлению gmTNF-индуцированного снижения количества эритроидных колоний и gmTNF-индуцированного повышения численности КОЕ-ГМ до исходного уровня [8]. Нами показано, что rhTNF в дозе 2 нг/мл и 20 нг/мл обладает способностью ингибировать рост как эритроидных, так и гранулоцитарно-макрофагальных колоний, образуемых ККМ человека. VARV-CrmB дозозависимым образом восстанавливает rhTNF-обусловленное снижение колониюобразующей способности гемопоэтических предшественников.

## 3. Изучение противовоспалительных эффектов VARV-CrmB в модели ЛПС-индуцированного септического шока у мышей

Кроме эффективной TNF-нейтрализующей активности *in vitro* показано, что VARV-CrmB

оказывает выраженный лечебный эффект на проявления LPS-индуцированного эндотоксического шока у SPF мышей линии Balb/C, достоверно увеличивая процент выживших животных. Гистологическое изучение внутренних органов и головного мозга экспериментальных животных показало, что VARV-CrmB предупреждает появление инфарктов в сердце, снижает степень нарушений кровообращения в сосудах внутренних органов, головного мозга и брыжейки, препятствует развитию острой почечной недостаточности, наблюдаемые у животных контрольной группы [1].

#### **4. Изучение эффектов VARV-CrmB в модели коллаген-индуцированного артрита (КИА) у мышей**

##### **4.1. Сравнительная оценка клинических проявлений КИА при введении поли-AbTNF и VARV-CrmB**

Развитие КИА на ранних сроках (2 и 7 суток) после разрешающей инъекции коллагена II характеризовалось эритемой и отеком преимущественно задних конечностей мышей (группа мышей КИА). На 14 и 21 сутки наблюдения выявлены: эритема и отек не только задних, но и передних конечностей, а также видимая деформация суставов с ограничением их подвижности. Ширина лапы и тибиотарзального сустава мышей на всех сроках развития КИА была достоверно большей, чем у животных контрольной группы (максимальное увеличение ширины лапы наблюдалось на 7 сутки, а ширины тибиотарзального сустава — на 14 сутки развития КИА). Введение поли-AbTNF (группа мышей КИА+AbTNF) приводило к снижению отечности конечности мышей на всех сроках исследования, а ширины тибиотарзального сустава — начиная с 7 суток наблюдения. Однако снижение ширины лапы и тибиотарзального сустава при введении поли-AbTNF на ранних сроках наблюдения (2 и 7 сутки) статистически не отличалась от данных у животных II группы (КИА), а на поздних (14 и 21 сутки) сроках — эти изменения были статистически значимыми. Подобные результаты были получены при введении мышам VARV-CrmB (группа мышей КИА+VARV-CrmB). При этом снижение ширины лап и тибиотарзального сустава у мышей данной группы была более значимой, чем у животных, получавших поли-AbTNF.

В динамике развития КИА наблюдали закономерное усиление клинических проявлений артрита, которое повышается вплоть до 21 суток наблюдения. Введение поли-AbTNF и VARV-CrmB приводило к снижению степени активности ар-

трита у мышей на ранних сроках наблюдения. Так, только через 2 суток после введения поли-AbTNF сумма баллов по шкале была статистически ниже, чем у мышей группы КИА. В то же время, у мышей группы КИА+VARV-CrmB сумма баллов была достоверно меньшей на 2 и 7 сут. Затем, к 14 и 21 суткам показатели шкальной оценки степени активности артрита во всех сравниваемых группах практически не различались.

Таким образом, при введении VARV-CrmB улучшение клинического состояния КИА имеет более продолжительный характер, чем при инъекции поли-AbTNF. Однако к концу срока наблюдения у животных всех групп клинические проявления артрита (шкальная оценка) практически не различались между собой.

##### **4.2. Изменение коллагенолитической активности сыворотки крови и содержания суммарных сывороточных гликозаминогликанов в динамике развития КИА и при введении поли-AbTNF и VARV-CrmB**

Результаты исследования показали, что коллагенолитическая активность сыворотки крови (КАС) в динамике развития КИА закономерно возрастает, достигая максимума к 14 суткам наблюдения, что свидетельствует о повышении суммарной активности коллагеназы и протеаз [10]. Введение поли-AbTNF и VARV-CrmB приводило к снижению КАС, причем при воздействии VARV-CrmB наблюдается более выраженный эффект.

Активация КАС в динамике развития КИА сопровождается разрушением хрящевой ткани, о чем свидетельствует возрастание уровня сывороточных гликозаминогликанов (сГАГ). Введение мышам поли-AbTNF и VARV-CrmB приводит к снижению уровня сГАГ.

##### **4.3. Изменение численности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови и костномозговых гранулоцитарно-макрофагальных предшественников в динамике развития КИА при введении поли-AbTNF и VARV-CrmB**

Развитие воспалительного процесса реализуется за счет эффекторных клеток крови (нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов), имеющих костномозговое происхождение. В нашем исследовании при развитии КИА происходит увеличение как относительной, так и абсолютной численности нейтрофилов крови, которые играют ключевую роль в реализации воспалительного процесса. Результаты исследования показали, что введение поли-AbTNF и VARV-CrmB приводит к снижению численности нейтрофилов крови.

Пополнение популяции нейтрофильных гранулоцитов в процессе развития КИА происходит, очевидно, за счет увеличения численности гранулоцитарно-макрофагальных предшественников в условиях активной продукции TNF. Повышение количества КОЕ-ГМ наблюдалось в группе КИА на всех сроках исследования. В работе [27] также показан стимулирующий эффект TNF в концентрации 2 нг на рост КОЕ-ГМ, в то время как эритроидная дифференцировка была подавлена. Опубликованы данные об увеличении гранулоцитарно-макрофагального и снижении эритроидного компартмента под влиянием TNF при введении его *in vivo* [18].

Показано, что введение животным поли-Ab<sub>TNF</sub> и VARV-CrmB приводит к достоверному снижению числа КОЕ-ГМ на 7 сутки наблюдения, а на последующие сроки исследования не наблюдается корректирующих эффектов от введения препаратов, а на 3 неделе обнаруживается достоверная стимуляция исследуемого показателя под воздействием VARV-CrmB.

#### **4.4. Состояние окислительно-метаболической функции лейкоцитов крови в динамике развития КИА у мышей и при введении поли-AbTNF и VARV-CrmB**

Результаты исследования показали, что окислительно-метаболическая функция (ОМФ) лейкоцитов крови в динамике развития КИА значительно усиливается и сохраняется на высоком уровне до конца срока наблюдения. Введение поли-AbTNF и VARV-CrmB мышам с КИА приводило к достоверному снижению ОМФ лейкоцитов крови. При этом, VARV-CrmB оказывал более выраженный эффект на ОМФ лейкоцитов крови мышей с КИА.

#### **5. Изучение эффектов VARV-CrmB при эпикутанном воздействии gmTNF и в модели экспериментального дерматита у мышей**

Аллергический контактный дерматит относится к аллергическим реакциям замедленного типа и развивается в 2 этапа: в афферентной фазе гаптены проникают в кожу, захватываются резидентными дендритными клетками эпидермиса — клетками Лангерганса (ДК/КЛ), которые затем мигрируют в регионарные лимфатические узлы и индуцируют активацию специфических Т-клеточных предшественников. TNF является главным звеном в запуске воспалительной реакции кожи в ответ на контакт с повреждающим агентом [13]. Вторая, эфферентная фаза контактной реакции индуцируется повторным контактом кожи с гаптенем на любом отдаленном от места первого контакта участке. Это приво-

дит к быстрому рекрутированию специфических Т-лимфоцитов и локальной воспалительной реакции, с максимальными проявлениями через 24-48 часов после провокации. Эта реакция затем постепенно затухает при участии цитокинов IL-4 и IL-10 [11]. Блокада провоспалительных цитокинов с помощью моноклональных антител существенно снижает миграцию дендритных клеток в дренирующие лимфатические узлы и вызывает ослабление повреждений кожи [21]. Миграции лейкоцитов из кожного эксплантата оценивалась по Larsen et al. [23].

#### **5.1. Изучение влияния gmTNF и VARV-CrmB на миграционную и окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов, а также костномозговой гемопоэз мышей при эпикутанном способе воздействия**

При аппликации gmTNF на дорзальную поверхность ушей наблюдалось достоверное увеличение количества мигрирующих лейкоцитов. При обработке мышей VARV-CrmB миграционная активность клеток не менялась. В то же время gVARV-CrmB достоверно снижал количество мигрирующих лейкоцитов у gmTNF-обработанных мышей.

Результаты исследования окислительно-метаболической активности лейкоцитов показали, что уже через 2 ч после эпикутанной обработки gmTNF происходит усиление активности ОМФ лейкоцитов крови мышей, которое достигает максимума через 24 ч, а затем постепенно снижается, достигая контрольных величин к 72 ч наблюдения. При эпикутанной аппликации VARV-CrmB после воздействия gmTNF данный показатель значительно снижался, свидетельствуя о TNF-нейтрализующей способности белка [9].

В работе исследовалось влияние TNF-нейтрализующего рекомбинантного белка VARV-CrmB и gmTNF при эпикутанном способе воздействия на колониеобразующую активность клеток костного мозга (ККМ) мышей. Через 30 мин после аппликации gmTNF наносился исследуемый белок, и через 24 оценивалось количество колоний гемопоэтических предшественников (БОЕ-Э, КОЕ-Э, КОЕ-ГМ) в метилцеллюлозной культуре. В другом эксперименте gmTNF+VARV-CrmB аппликацировались трехкратно в течение трех суток, и через 24 оценивалось количество колоний гемопоэтических предшественников (БОЕ-Э, КОЕ-Э, КОЕ-ГМ) в метилцеллюлозной культуре.

Накожные аппликации gmTNF в течение трех суток вызывают статистически достоверное снижение количества эритроидных колоний (БОЕ-

Э+КОЕ-Э), в основном за счет поздних КОЕ-Э. Совместное эпикутанное нанесение TNF+VARV-CrmB восстанавливает количество эритроидных колоний (в том числе КОЕ-Э). После аппликации rhTNF повышается количество КОЕ-ГМ, VARV-CrmB достоверно снижает их количество до уровня контрольных значений. Аналогичные изменения наблюдаются через сутки после однократной аппликации.

Таким образом, TNF-блокирующие свойства VARV-CrmB продемонстрированы при эпикутанных аппликациях VARV-CrmB и rhTNF: VARV-CrmB оказывает корректирующие эффекты в отношении TNF-зависимых изменений колониеобразующей активности гемопоэтических предшественников.

### 5.2. Изучение противовоспалительного потенциала VARV-CrmB в модели экспериментального дерматита у мышей

Для оценки миграции дендритных клеток из эпидермиса мышам линии Balb/c апплицировали раствор ДНХБ на дорзальную сторону обеих ушей и через 30 минут VARV-CrmB в физиологическом растворе. Контролем служил растворитель; в качестве положительного контроля животным вводили подкожно в ушную раковину поликлональные АТ к TNF $\alpha$  в дозе 3 мкг/мышь. Через 17 часов готовили кожные эксплантаты, помещали их в 24-луночный планшет, и через 24 часа культивирования подсчитывали мигрировавшие клетки.

Показано, что аппликативное воздействие VARV-CrmB достоверно снижает миграцию лейкоцитов, вызванную аллергеном. Внутрикожное введение поли-AbTNF также эффективно снижает миграцию лейкоцитов. Полученные результаты демонстрируют эффективность VARV-CrmB в изучаемой модели.

Для оценки влияния аппликативных воздействий VARV-CrmB на клеточный иммунный ответ использовали метод «величина отека уха» (MEST) на фоне ДНХБ [14]. 50 мкл 1% раствора ДНХБ наносили на межлопаточную область мышей Balb/c в течение 3-х дней. VARV-CrmB наносили на этот же участок кожи через 30 минут после аллергена, животным контрольной группы апплицировали растворитель.

На 5-ый день от начала аппликаций всем животным наносили 25 мкл 0,5% ДНХБ на обе поверхности левого уха, на правое наносили такое же количество растворителя. Через 24, 48 и 72 часа измеряли толщину обеих ушей с помощью электронного штангенциркуля, за величину отека принимали разницу толщины левого и правого ушей для каждого животного. Показано,

что аппликативное воздействие VARV-CrmB достоверно снижает показатель отека уха. Кроме того, при воздействии VARV-CrmB отмечалось более раннее отторжение струпа в очаге воспалительной реакции, что может свидетельствовать об ускорении процесса ранозаживления под влиянием VARV-CrmB.

## Заключение

Получен рекомбинантный белок вируса натуральной оспы – VARV-CrmB и изучены его физико-химические свойства. Исследованы биологические эффекты VARV-CrmB *in vitro*. Установлено, что предварительная соинкубация TNF и VARV-CrmB в различных концентрациях (100 нг/мл и 10 нг/мл) полностью отменяет эффекты TNF на продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6 в культуре МНК, а концентрации цитокинов снижается до уровня спонтанной продукции. Белок VARV-CrmB обладает большей по сравнению с полиAb<sub>TNF</sub> и моноAb<sub>TNF</sub> TNF-нейтрализующей способностью на продукцию IL-1 и IL-6 моноклонирами. При изучении влияния VARV-CrmB на TNF-индуцированную генерацию активных метаболитов кислорода установлено, что тестируемый белок отменяет TNF-стимулированный хемилюминесцентный ответ МНК в большей степени, чем специфическое антитело против TNF.

В модели костномозгового гемопоэза мышей Balb/c показано, что совместное воздействие rhTNF и VARV-CrmB приводит к восстановлению rhTNF-индуцированного снижения количества эритроидных колоний и rhTNF-индуцированного повышения численности КОЕ-ГМ до исходного уровня. rhTNF обладает способностью ингибировать рост как эритроидных, так и гранулоцитарно-макрофагальных колоний, образуемых ККМ человека. Воздействие VARV-CrmB дозозависимым образом восстанавливает rhTNF-обусловленное снижение колониеобразующей способности гемопоэтических предшественников.

Исследования *in vivo* показали, что VARV-CrmB оказывает выраженный лечебный эффект на проявления LPS-индуцированного эндотоксического шока у SPF мышей линии Balb/C, достоверно увеличивая процент выживших животных.

На модели коллаген-индуцированного артрита (КИА) показано, что введение поли-AbTNF и VARV-CrmB приводит к снижению степени активности артрита, коллагенолитической активности сыворотки и содержания гликоза-

миногликанов на ранних сроках КИА. VARV-CrmB оказывает более выраженный эффект, чем AbTNF. Введение поли-AbTNF и VARV-CrmB приводит к снижению численности нейтрофильных гранулоцитов и ГМ-предшественников (на ранних сроках) в процессе развития КИА. Введение поли-AbTNF и VARV-CrmB приводит к достоверному снижению окислительно-метаболической активности лейкоцитов, причем более выраженный эффект наблюдается при воздействии VARV-CrmB.

TNF-блокирующие свойства VARV-CrmB продемонстрированы при эпикутанных аппликациях gmTNF и VARV-CrmB. Эпикутанное воздействие VARV-CrmB нормализует повышенную миграционную и окислительно-метаболическую активность лейкоцитов gmTNF-обработанных мышей. При эпикутанном воздействии VARV-CrmB оказывает корригирующие эффекты в отношении TNF-зависимых изменений колониеобразующей активности гемопоэтических предшественников.

Исследование противовоспалительного потенциала VARV-CrmB в модели контактного дерматита продемонстрировало, что аппликативное воздействие VARV-CrmB достоверно снижает миграцию лейкоцитов из кожного лоскута в афферентной фазе контактной реакции на ДНХБ; этот эффект сравним с внутрикожным введением поли-AbTNF. Показано, что аппликативное воздействие VARV-CrmB достоверно снижает показатель «отека уха» в эфферентной фазе контактной реакции на ДНХБ. Кроме того, при воздействии VARV-CrmB отмечалось более раннее отторжение струпа в очаге воспалительной реакции, что может свидетельствовать об ускорении процесса ранозаживления под влиянием VARV-CrmB. Полученные результаты демонстрируют TNF-блокирующие свойства VARV-CrmB, причем в ряде случаев исследуемый белок проявляет более выраженные эффекты по сравнению с поли-AbTNF.

Таким образом, совокупность полученных нами данных позволяет рассматривать рекомбинантный вирусный белок VARV-CrmB как новый потенциальный TNF-антагонист, эффекты которого могут быть реализованы за счет его нейтрализующей способности TNF-индуцированной активации окислительно-метаболической, цитокин-продуцирующей и миграционной функций эффекторных клеток при терапии патологических воспалительных процессов.

## Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (гос. Контракт 02.740.11.0485) и РФФИ (грант 10-04-00387а).

## Список литературы

1. Гилева И.П., Малкова Е.М., Непомнящих Е.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. — № 1. — С. 44-49.
2. 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. 1664-1667.
3. 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.
4. 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.
5. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Непомнящих Е.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 // Молекуляр. биология. — 2005. — Т. 39. — С. 218-225.
6. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимические и патофизиологические аспекты — М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. — 343 с.



7. 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.
8. Топоркова Л.Б., Петухова А.А., Гилева И.П., Орловская И.А. Рекомбинантный белок вируса натуральной оспы нейтрализует эффекты фактора некроза опухолей на модели костно-мозгового гемопоэза мышей BALB/C // Медицинская иммунология. — 2010. — Т. 12, № 4-5. — С. 297-304.
9. Цырендоржиев Д.Д., Сенников С.В., Вязовая Е.А., Гилева И.П., Щелкунов С.Н., Рязанкин И.А., Лебедев Л.Р., Топоркова Л.Б., Курилин В.В., Петухова А.А., Орловская И.А. Влияние рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы на миграционную и окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов крови мышей при эпикутанной аппликации фактора некроза опухолей // Бюллетень СО РАМН. — 2011. — № 3. — С. 73-78.
10. Шараев П.Н., Пишков В.Н., Зворыгина Н.Г. и др. Определение коллагенолитической активности плазмы крови // Лабораторное дело. — 1987. — № 1. — С. 60-62.
11. Akiba H., Kehren J., Ducluzeau M.-T., Krasteva M., Horand F., Kaiserlian D., Kaneko F., Nicolas J.-F. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8<sup>+</sup> T cytotoxic cells inducing keratinocyte apoptosis // J. Immunol. — 2002. — Vol. 168. — P. 3079-3087.
12. Blinov V.M., Shchelkunov S.N., Sandakhchiev L.S. A possible molecular factor responsible for the generalization of smallpox infection // Dokl. Ross. Akad. Nauk. — 1993. — Vol. 328. — P. 109-111.
13. Enk A.H., Katz S.I. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity // PNAS USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 1398-1402.
14. Garrigue J.L., Nicolas J.F., Fraguinals R., Benezra C., Bour H., Schmitt D. Optimization of the mouse ear swelling test for *in vivo* and *in vitro* studies of weak contact sensitizers // Contact Dermatitis — 1994. — Vol. 30. — P. 231-237.
15. Gartlehner G., Hansen R.A., Jonas B.L. et al. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systemic review and metaanalysis // J. Rheumatol. — 2006. — Vol. 33. — P. 2398-2408.
16. Gileva I.P., Nepomnyashchich T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Shchelkunov S.N. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different // Bioch. Bioph. Acta. — 1992. — Vol. 1764. — P. 1710-1718.
17. Hasegawa A., Takasaki W., Greene M.I., Murali R. Modifying TNF 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- $\alpha$  in Normal and Erythroleukemic Mice: Characterization and Therapeutic Applications // Blood. — 1988. — Vol. 72. — P. 1875-1883.
19. Juurikivi A., Sandler C., Lindstedt K.A. et al. Inhibition of c-kit tyrosine kinase by imatinib mesylate induces apoptosis in mast cells in rheumatoid synovia: a potential approach to the treatment of arthritis // Ann. Rheum. Dis. — 2005. — Vol. 64, N 8. — P. 1126-1131.
20. Kirou K. A., Mavragani C. P. TNF antagonists in the management of early rheumatoid arthritis: an overview // Int J. Adv. Rheumatol. — 2006. — N 4. — P. 49-56.
21. Kobayashi Y., Matsumoto M., Kotani M., Makino T. Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation // J. Immunol. — 1999. — Vol. 163. — P. 5989-5993.
22. Kremer J.M., Westhovens R., Leon M. et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig // N. Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 49. — P. 1907-1915.
23. Larsen C.P., Steinman R.M., Witmer-Pack M., Hankins D.F., Morris P.J., Austyn J.M. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants // J. Exp. Med. — 1990. — Vol. 172. — P. 1483-1493.
24. Mc Devitt H., Munson S., Ettingen R., Wu A. Multiple roles for tumor necrosis factor- $\alpha$  and lymphotoxin  $\alpha/\beta$  in immunity and autoimmunity // Arthritis Res. — 2002. — N 4 (suppl. 13). — P. 141-152.
25. 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- $\alpha$  antibody therapy // *Blood*. — 2002. — Vol. 100. — P. 474-482.

26. Redlich K., Schett G., Sterner G. et al. Rheumatoid arthritis therapy after tumor necrosis factor and interleukin-1 blockade // *Arthritis Rheum.* — 2003. — Vol. 48. — P. 3108-3119.

27. Rusten L.S., Jacobsen S.E. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  directly inhibits human

erythropoiesis *in vitro*: role of p55 and p75 TNF receptors // *Blood*. — 1995. — Vol. 85. — P. 989-996.

28. Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Sandakhchiev L.S. Genes of variola and vaccinia viruses needed for overcoming of the host protective mechanisms // *FEBS Lett.* — 1993. — Vol. 319. — P. 80-83.

*поступила в редакцию 28.07.2011*

*отправлена на доработку 12.10.2011*

*принята к печати 12.11.2011*