

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО TNF-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ В МОДЕЛИ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО АРТРИТА

Цырендоржиев Д.Д.<sup>1,3</sup>, Сенников С.В.<sup>1</sup>, Орловская И.А.<sup>1</sup>, Гилева И.П.<sup>2</sup>, Рязанкин И.А.<sup>2</sup>, Топоркова Л.Б.<sup>1</sup>, Курилин В.В.<sup>1</sup>, Лопатникова Ю.А.<sup>1</sup>, Грыдина А.А.<sup>3</sup>, Щелкунов С.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** В статье представлены результаты исследования эффективности рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы (VARV-CrmB) в модели коллаген-индуцированного артрита (КИА) у мышей (CBAxС57Bl6)F1. При введении VARV-CrmB и поликлональных антител к рекомбинантному мышинному TNF (poly-Ab<sub>MuTNF</sub>) происходило улучшение клинических проявлений КИА за счет снижения отечности и увеличения подвижности конечностей мышей. Введение VARV-CrmB и poly-Ab<sub>MuTNF</sub> приводит к снижению численности нейтрофильных гранулоцитов и гранулоцитарных предшественников. Показано, что введение мышам VARV-CrmB и poly-Ab<sub>MuTNF</sub> приводит к снижению коллагенолитической активности сыворотки крови и содержания гликозаминогликанов на ранних сроках исследования. Введение VARV-CrmB и poly-Ab<sub>MuTNF</sub> мышам с КИА приводило к снижению хемилюминесцентного ответа лейкоцитов крови. VARV-CrmB оказывал более выраженный ингибирующий эффект на продукцию активных метаболитов кислорода лейкоцитами крови мышей с КИА, чем poly-Ab<sub>MuTNF</sub>. Установлено, что улучшение клинического состояния у мышей с КИА имеет более продолжительный характер при введении VARV-CrmB, чем при инъекции poly-Ab<sub>MuTNF</sub>.

Результаты исследования позволяют рассматривать рекомбинантный вирусный белок VARV-CrmB как новый потенциальный TNF-антагонист

**Ключевые слова:** фактор некроза опухолей, коллаген, ортопоксвирусы, лейкоциты, ревматоидный артрит

## Адрес для переписки:

Цырендоржиев Дондок Дамдинович  
д.м.н., профессор, ведущий  
научный сотрудник лаборатории  
иммунобиологии стволовой  
клетки ФГБУ «НИИ клинической  
иммунологии» СО РАМН  
630099, Россия, г. Новосибирск,  
ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 333-56-42.  
E-mail: tsdon@mail.ru

## Авторы:

Цырендоржиев Д.Д. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник  
лаборатории иммунобиологии стволовой клетки ФГБУ «НИИ клинической  
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия  
Сенников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной  
иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск,  
Россия  
Орловская И.А. — д.м.н., заведующая лабораторией иммунобиологии стволовой  
клетки ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск,  
Россия  
Гилева И.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела геномных исследований  
и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов ФГБУН ГНЦ ВБ  
«Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия  
Рязанкин И.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела геномных  
исследований и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов ФГБУН  
ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия  
Топоркова Л.Б. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории  
иммунобиологии стволовой клетки ФГБУ «НИИ клинической иммунологии»  
СО РАМН, г. Новосибирск, Россия  
Курилин В.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной  
иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск,  
Россия  
Лопатникова Ю.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории  
молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН,  
г. Новосибирск, Россия  
Грыдина А.А. — аспирант кафедры медицинской химии ГБОУ ВПО  
«Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,  
г. Новосибирск, Россия  
Щелкунов С.Н. — д.б.н., профессор, заведующий отделом геномных исследований  
и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов ФГБУН ГНЦ ВБ  
«Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Поступила 25.04.2013

Отправлена на доработку 07.05.2013

Принята к печати 08.05.2013

# EFFICIENCY OF RECOMBINANT TNF-BINDING PROTEIN FROM VARIOLA VIRUS IN A MODEL OF COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS

Tsyrendorzhiev D.D.<sup>a,c</sup>, Sennikov S.V.<sup>a</sup>, Orlovskaya I.A.<sup>a</sup>, Gileva I.P.<sup>b</sup>, Ryazankin I.A.<sup>b</sup>, Toporkova L.B.<sup>a</sup>, Kurilin V.V.<sup>a</sup>, Lopatnikova Yu.A.<sup>a</sup>, Grydina A.A.<sup>c</sup>, Schelkunov S.N.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Clinical Immunology Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

<sup>c</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** This paper presents the results of the research on the effectiveness of recombinant TNF-binding protein of variola virus (VARV-CrmB) in a model of collagen-induced arthritis (CIA) in mice (CBAx57Bl6) F1. The introduction of VARV-CrmB and polyclonal antibody to recombinant mouse TNF (poly-Ab<sub>MuTNF</sub>) led to an improvement of clinical manifestations of CIA by reducing the swelling and increasing the mobility of mice limbs. The introduction of VARV-CrmB and poly-Ab<sub>MuTNF</sub> reduced the number of neutrophilic granulocytes and granulocytic precursors. The introduction of VARV-CrmB and poly-Ab<sub>MuTNF</sub> into mice decreased collagenolysis in the blood serum and the content of glycosaminoglycans at the early stages of experimentation. Treatment with VARV-CrmB and poly-Ab<sub>MuTNF</sub> of mice with CIA significantly decreased the chemiluminescence response of blood leukocytes. VARV-CrmB exerted more pronounced inhibitory effect on the production of reactive oxygen metabolites by blood leukocytes of mice with CIA than poly-Ab<sub>MuTNF</sub>. Improvement of clinical condition of the mice with CIA has a more prolonged effect following introduction of the VARV-CrmB than after injection of poly-Ab<sub>MuTNF</sub>. The results suggest the recombinant viral protein VARV-CrmB to be a new potential TNF-antagonist. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 6, pp 513-524)

**Keywords:** tumor necrosis factor, collagen, variola virus, leukocytes, rheumatoid arthritis

## Address for correspondence:

Tsyrendorzhiev Dondok D.  
PhD, MD, Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiology Stem Cell, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch  
630099, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 333-56-42.  
E-mai: tsdon@mail.ru

## Authors:

Tsyrendorzhiev D.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiology Stem Cell, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation  
Sennikov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation  
Orlovskaya I.A., PhD, MD (Medicine), Chief, Laboratory of Immunobiology Stem Cell, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation  
Gileva I.P., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Genome Research and Development of Methods for DNA Diagnostics Poxviruses, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation  
Ryazankin I.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Genome Research and Development of Methods for DNA Diagnostics Poxviruses, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation  
Toporkova L.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunobiology Stem Cell, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation  
Kurilin V.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation  
Lopatnikova Yu.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation  
Grydina A.A., PhD Candidate, Department of Medical Chemistry, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation  
Shchelkunov S.N., PhD, MD (Biology), Professor, Chief, Department of Genome Research and Development of Methods for DNA Diagnostics Poxviruses, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Received 25.04.2013

Revision received 07.05.2013

Accepted 08.05.2013

## Введение

Ревматоидный артрит (РА) — чрезвычайно гетерогенное заболевание, патогенез которого представляет сложное и слабо изученное сочетание генетически детерминированных и приобретенных дефектов иммунорегуляторных механизмов, ограничивающих патологическую активацию иммунной системы в ответ на потенциально патогенные и нередко на физиологические стимулы [22].

Ключевую роль в механизмах развития РА играют тесно взаимосвязанные процессы: антиген-специфическая активация CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов по Th1-типу, характеризующаяся избыточным синтезом IL-2, IFN $\gamma$ , IL-17, IL-18, и гиперпродукция провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-15. Из широкого спектра медиаторов ведущую роль в патогенезе РА отводят таким провоспалительным цитокинам, как TNF $\alpha$ , IL-1 и IL-6, которые прямо или опосредованно участвуют в повреждении суставной ткани и в развитии системных проявлений заболевания [9].

В настоящее время усилиями ученых многих стран не только разработаны принципы антицитокиновой стратегии лечения больных с различными заболеваниями, в патогенезе которых ключевую роль играют цитокины, но и внедрены в практическую медицину лекарственные средства, способные ингибировать биологические эффекты цитокинов [7, 8]. Действующим началом этих препаратов являются моноклональные антитела [16, 38] или рекомбинантные химерные белки, состоящие из соответствующих рецепторных и иммуноглобулиновых доменов [18]. Однако в клинической практике около 30–40% пациентов остаются рефрактерными 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 побочных эффектов [24, 29]. Лечение известными в настоящее время ингибиторами TNF может сопровождаться развитием инфекционных осложнений, в первую очередь туберкулезной [37] и латентной вирусной инфекцией [18]. Причины и механизмы таких осложнений остаются до конца не выясненными. Следовательно, существует необходимость создания препаратов нового типа, более безопасных и эффективно блокирующих активность TNF. В связи с этим, во многих лабораториях мира продолжается активный поиск новых антицитокиновых препаратов, которые могли бы удовлетворить требования клинической медицины. Относительно недавно нами был выделен и охарактеризован новый тип TNF-антагониста — TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы (VARV-CrmB) [18], ос-

нованный на эволюционно выработанных свойствах защиты вирусов от действия иммунной системы макроорганизма [7, 15]. Предварительные исследования показали, что VARV-CrmB эффективно нейтрализует TNF при экспериментальном септическом шоке [1, 3, 25], ингибирует миграционную и окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов крови мышей при эпикутанной аппликации TNF [10]. Кроме того, нами было показано, что VARV-CrmB ингибирует TNF-индуцированную ОМФ и цитокин-продуцирующую активность мононуклеарных клеток здоровых доноров [11]. Однако для уточнения механизмов TNF-нейтрализующего эффекта есть необходимость в проведении всесторонних исследований биологических свойств VARV-CrmB, для чего требуется выбрать адекватную модель из множества экспериментальных моделей РА.

**Цель исследования:** исследовать эффективность TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы в модели коллаген-индуцированного артрита у мышей (CBAxС57Bl/6)F1.

## Материалы и методы

### Реактивы и среды

В работе использовался рекомбинантный TNF мыши (MuTNF), выделенный из бактериального штамма-продуцента (1,5 мг/мл,  $3 \times 10^7$  ME) [2]. Выделение рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы VARV-CrmB проводили, как описано в работе [5]. Антисыворотку к TNF мыши (poly-Ab<sub>MuTNF</sub>) получали путем иммунизации кроликов рекомбинантным MuTNF. Фракционирование лизатов клеток и Вестерн-блот анализ проводили, как описано в работе [25].

В работе использовались: среда M 3434 (Stem Cell Technology, Canada), среда Metho Cult GF H 4434 (Stem Cell Technology, Canada), среда RPMI-1640, бычий коллаген II типа («Sigma»).

### Животные

В экспериментах использовали мышей линии (CBAxС57Bl/6)F1 в возрасте 4 мес. и массой 20–25 г, полученных из вивария НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Животных содержали в условиях вивария на сбалансированном питании и в свободном доступе к воде. Животных содержали и выводили из эксперимента в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

**Коллаген-индуцированный артрит (КИА)** моделировали на мышцах линии (CBAxС57Bl/6)F1, с использованием бычьего коллагена II типа («Sigma», США). Для моделирования КИА в заднюю часть спины мышей подкожно вводили

бычий 45 мкг коллагена II типа, растворенного 0,1 М уксусной кислотой с полным адьювантом Фрейнда («Difco»). Через 18 суток повторно вводили коллаген II типа (45 мкг) с неполным адьювантом Фрейнда («Difco») (разрешающая инъекция) в область основания хвоста мышей в 4–6 точках [33]. Всего каждому животному вводили по 90 мкг коллагена II типа. Poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB вводили мышам через 4 часа после разрешающей инъекции коллагена II типа, когда в крови животных увеличивается концентрация TNF [29].

Животные были разделены на 4 группы: I-я – контрольная (животным вводили физ. раствор), II-я – мыши с КИА, III-я – животные с КИА, которым внутрибрюшинно вводили poly-Ab<sub>MuTNF</sub> по 2 мкг/мышь, и IV-я – мыши с КИА, которым внутрибрюшинно вводили по 2 мкг/мышь VARV-CrmB.

#### Оценка степени активности КИА

Характер и степень активности КИА оценивали по 4-точечной шкале на каждой конечности [28]. Критериями шкальной оценки активности КИА были: 0 – нормальный вид суставов и сохраненный объем движения в суставах; 1 – эритемы и отек конечностей; 2 – видимая деформация суставов; 3 – анкилоз суставов при сгибании суставов.

**Количество форменных элементов периферической крови** определяли с помощью гематологического анализатора ERMA PC190 (Япония) в образцах крови объемом 40 мкл, взятых из кончика хвоста животного. Относительное количество форменных элементов крови подсчитывали на мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе.

#### Оценка числа коммитированных предшественников клеток костного мозга

Костный мозг мышей (CBAxС57Bl/6)F1 вымывали из бедренной кости с помощью шприца кондиционной средой RPMI1640, содержащей 10% телячьей сыворотки. Подсчитывали количество клеток костного мозга в 1 мл с помощью гематологического анализатора ERMA PC190 (Япония). Для определения числа коммитированных предшественников клетки костного мозга мыши в концентрации  $2,5 \times 10^4$ /мл инкубировали на 24-луночных планшетах в метилцеллюлозной среде M 3434 (Stem Cell Technology, Canada), содержащей цитокины SCF, EPO, IL-3, IL-6. Гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГМ) и эритроидные (БОЕ-Э, КОЕ-Э) колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом после 14-дневной инкубации при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, согласно рекомендациям Stem Cell Technologies, Canada.

#### Оценка структурно-метаболических изменений соединительной ткани

О структурно-метаболических изменениях соединительной ткани в динамике развития КИА судили по коллагенолитической активности сыворотки (КАС) крови мышей и по суммарному содержанию гликозаминогликанов (ГАГ) по методикам П.Н. Шараева и соавт. [12, 13]. Суммарное содержание ГАГ (кислые мукополисахариды) в сыворотке крови определяли с использованием ТХУ и карбозольной реакции. Величины КАС и ГАГ выражали в мкмоль/л оксипролина на 1 л сыворотки за 1 час (мкмоль оксипролина/л) и мкмоль/л гексурононовой кислоты в 1 л сыворотки (мкмоль/л) соответственно.

**Окислительно-метаболическую функцию (ОМФ) лейкоцитов крови** животных оценивали с помощью метода люминол-зависимого хемилюминесцентного (ХЛ) анализа [36]. Измерение интенсивности ХЛ ответа лейкоцитов крови проводили с помощью мультимодального планшетного ридера «LB 941 TriStar» («Berthold Technologies», Германия). В качестве люминофора использовали очищенный люминол (5-амино-2,3-дигидрофталазиндион-1,4) («Serva», США). Регистрацию интенсивности ХЛ ответа лейкоцитов крови животных осуществляли через 3 мин в течение 30 мин. Результаты ХЛ исследования выражали как суммарный ХЛ ответ лейкоцитов:  $I_{sum} = n \text{ имп}/10^3 \text{ L}/30 \text{ мин}$ , где  $n$  – число импульсов, испускаемых  $10^3$  лейкоцитами (L) крови в течение 30-минутного исследования.

Статистическая обработка материала осуществлялась пакетом лицензированных программ Excel 7,0 и Statistica 7,0 с использованием средней арифметической, ошибки средней, критерия Стьюдента. Результаты считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

#### Изменение клинических проявлений КИА при введении poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB

На 2 и 7 сут. после разрешающей инъекции коллагена II типа течение КИА у мышей (II группа) характеризовалось эритемой и отеком задних конечностей, преимущественно в области тibiо-тарзальных суставов и лап. На 14 и 21 сут. наблюдения, помимо эритемы и отека всех конечностей, отмечена видимая деформация суставов с ограничением их подвижности. Судя по результатам шкальной оценки, у мышей с КИА происходило закономерное усиление клинических проявлений артрита, вплоть до 21 сут. наблюдения. Введение poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB мышам с КИА приводило к снижению активности артрита на ранних сроках наблюдения. После введения poly-Ab<sub>MuTNF</sub> сумма баллов шкальной

оценки была статистически ниже только на 2 сут. наблюдения по сравнению с мышами II группы. В то же время, после введения VARV-CrmB (IV группа) мышам с КИА сумма баллов шкальной оценки была достоверно меньше и на 7 сут. наблюдения. Однако к 14 и 21 сут. показатели шкальной оценки активности артрита во всех сравниваемых группах практически не отличались (табл. 1).

**Изменение показателей периферической крови, гранулоцитарно-макрофагального и эритроидного ростков костного мозга мышей в динамике развития КИА и при введении poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB**

Развитие любого воспалительного процесса, как известно, реализуется эффекторными клетками крови (нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов и др.) и зависит от изменения численности и их функционального состояния. В связи с этим в работе исследовали состояние периферической крови и гемопоэза в динамике развития КИА у мышей. Анализ периферической крови показал, что на ранних сроках (2 сут.) развития КИА общее количество лейкоцитов крови мышей снижается, затем к 7 сут. возрастает, что отражает классическую реакцию крови при воспалении. При введении poly-Ab<sub>MuTNF</sub> численность лейкоцитов крови мышей (III группа) менялась волнообразно. Так, на 2 сут. после введения poly-Ab<sub>MuTNF</sub> численность лейкоцитов мышей данной группы возрастала, к 7 сут. снижалась, а к 14 сут. — вновь возрастала. На 2 сут. после введения VARV-CrmB численность лейкоцитов крови мышей IV группы

снижалась, затем происходила постепенная нормализация (табл. 2).

В процессе развития КИА наблюдали увеличение как относительной, так и абсолютной численности нейтрофилов крови. При этом выявлено, что развитие КИА сопровождается смещением формулы крови влево, что свидетельствует о стимуляции костномозгового кроветворения. Пополнение популяции нейтрофильных гранулоцитов в динамике развития КИА происходит, очевидно, за счет увеличения численности гранулоцитарно-макрофагальных (ГМ) предшественников в условиях активной продукции TNF. Повышение количества КОЕ-ГМ наблюдалось в группе КИА на всех сроках исследования. Введение животным poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB приводило к достоверному снижению числа КОЕ-ГМ на 7 сут. наблюдения, на последующие сроки исследования не наблюдался корректирующий эффект от введения этих препаратов, а на 21 сут. наблюдения обнаруживалась статистически значимая стимуляция исследуемого показателя под воздействием VARV-CrmB (рис. 1).

**Изменение ОМФ лейкоцитов крови мышей в динамике развития КИА и при введении poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB**

Результаты исследования показали, что ОМФ лейкоцитов крови в динамике развития КИА значительно усиливается и сохраняется на высоком уровне до конца срока наблюдения, что свидетельствует об активности воспалительного процесса. Введение poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ШКАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО АРТРИТА У МЫШЕЙ И ПРИ ВВЕДЕНИИ poly-Ab<sub>TNF</sub> И VARV-CrmB, БАЛЛЫ (M±m)**

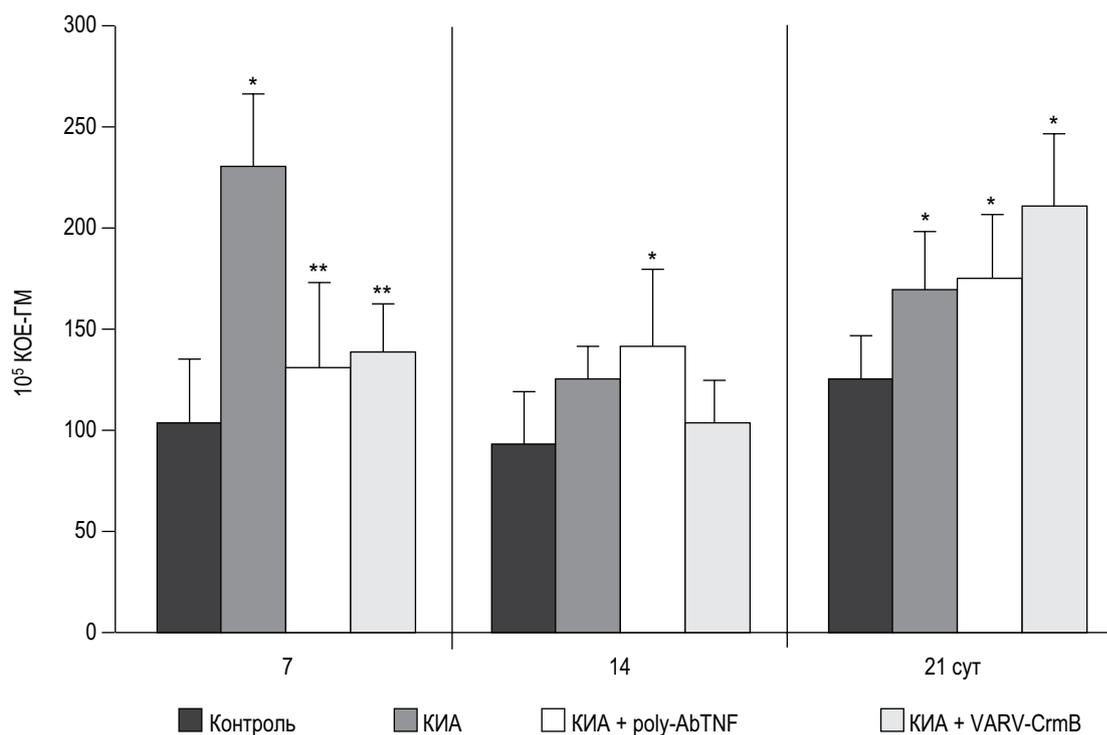
Группы животных	Срок наблюдения, сут.			
	2	7	14	21
I. Контроль	0	0	0	0
II. КИА	3,8±0,17	5,3±0,6	7,2±1,4	9,6±1,5
III. КИА + poly-Ab <sub>TNF</sub>	2,7±0,7*	4,4±0,9	6,9±0,8	9,7±1,2
IV. КИА + VARV-CrmB	2,2±0,3*	3,7±0,5*	6,2±0,6	9,3±1,7

**Примечание.** \* – статистические различия по сравнению с данными у животных II группы (p < 0,05).

**ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО АРТРИТА У МЫШЕЙ И ПРИ ВВЕДЕНИИ poly-Ab<sub>TNF</sub> И VARV-CrmB, 10<sup>6</sup>/L (M±m)**

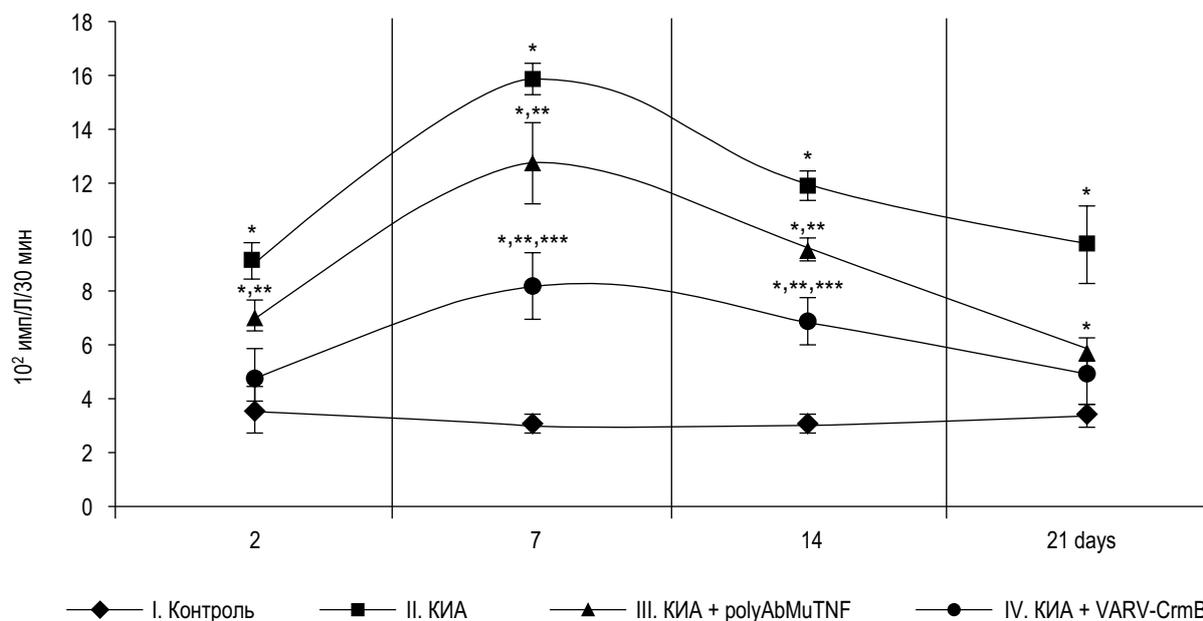
Группы животных	Срок наблюдения, сут.			
	2	7	14	21
I. Контроль	14,2±2,4			
II. КИА	10,6±0,2*	18,9±2,2*	14,1±2,3	11,3±5,0
III. КИА + poly-Ab <sub>TNF</sub>	17,1±2,1*,**	8,9±1,9*,**	17,2±3,4	10,4±2,1
IV. КИА + VARV-CrmB	9,4±0,6*,**,***	12,3±2,3***	19±5	10,9±3,4

**Примечание.** \* – статистические различия по сравнению с данными у мышей I группы (контроль); \*\* – по сравнению с данными у животных II группы; \*\*\* – по сравнению с данными у мышей III группы (p < 0,05).



**Рисунок 1. Влияние poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB на количество КОЕ-ГМ в процессе развития КИА**

**Примечание.** \* – статистические различия по сравнению с данными в контроле; \*\* – относительно данных у мышей II группы (КИА) ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 2. Изменение окислительно-метаболической функции лейкоцитов крови в динамике развития коллаген-индуцированного артрита у мышей и при введении poly-Ab<sub>TNF</sub> и VARV-CrmB**

**Примечание.** \* – статистические различия по сравнению с данными у мышей контрольной группы; \*\* – по сравнению с данными у мышей II группы (КИА) и \*\*\* – по сравнению с данными у мышей III группы (КИА + poly-Ab<sub>TNF</sub>).

**ТАБЛИЦА 3. КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО АРТРИТА У МЫШЕЙ И ПРИ ВВЕДЕНИИ poly-Ab<sub>TNF</sub> И VARV-CrmB, МКМОЛЬ ОКСИПРОЛИНА / л × ч (M±m)**

Группы животных	Срок наблюдения, сут.			
	2	7	14	21
I. Контроль	5,3±0,6	5,7±0,3	5,1±0,7	5,5±0,4
II. КИА	11,6±1,4*	18,1±2,2*	19,2±1,9*	17,4±2,4*
III. КИА + poly-Ab <sub>TNF</sub>	8,2±0,7*. **	16,1±1,4*	17,2±1,5*	17,6±1,8*
IV. КИА + VARV-CrmB	6,4±0,6*. **	9,7±1,6*. **, ***	16,3±2,5*	15,7±2,1*

**Примечание.** \* – статистические различия по сравнению с данными у мышей I группой (контроль); \*\* – по сравнению с данными у животных II группы; \*\*\* – по сравнению с данными у мышей III группы (p < 0,05).

**ТАБЛИЦА 4. ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУММАРНЫХ СЫВОРОТОЧНЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО АРТРИТА У МЫШЕЙ И ПРИ ВВЕДЕНИИ poly-Ab<sub>TNF</sub> И VARV-CrmB, МКМОЛЬ/Л (M±m)**

Группы животных	Срок наблюдения, сут.			
	2	7	14	21
I. Контроль	21,3±1,2	20,7±1,6	19,7±1,5	20,1±1,4
II. КИА	32,3±2,2*	44,5±2,7*	41,2±2,4*	56,3±3,6*
III. КИА + poly-Ab <sub>TNF</sub>	26,2±1,5*. **	36,3±1,9*. **	40,7±2,8*	51,4±3,3*
IV. КИА + VARV-CrmB	25,7±1,7**	31,2±1,1*. **, ***	35,7±2,3*	49,3±2,7*

**Примечание.** \* – статистические различия по сравнению с данными мышей I группы (контроль); \*\* – по сравнению с данными у животных II группы; \*\*\* – по сравнению с данными у мышей III группы (p < 0,05).

мышам с КИА приводило к статистически значимому снижению ХЛ ответа лейкоцитов крови. При этом VARV-CrmB оказывал более выраженный эффект на ХЛ ответ лейкоцитов крови мышей с КИА, чем poly-Ab<sub>MuTNF</sub> (рис. 2).

**Изменение коллагенолитической активности сыворотки крови и содержания суммарных сывороточных гликозаминогликанов в динамике развития КИА и при введении poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB**

Результаты исследования показали, что коллагенолитическая активность сыворотки (КАС) крови в динамике развития КИА закономерно возрастает. КАС в динамике развития КИА достигает максимума к 14 сут. наблюдения. Введение poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB приводило к снижению КАС, причем при воздействии VARV-CrmB наблюдается более выраженный эффект (табл. 3).

Активация КАС в динамике развития КИА сопровождается разрушением хрящевой ткани, о чем свидетельствует повышение уровня сывороточных гликозаминогликанов (с-ГАГ). Введение мышам poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB приводит к снижению уровня с-ГАГ на ранних сроках развития КИА (2 и 7 сут.). Однако к концу срока исследования уровень с-ГАГ вновь возрастает и практически не отличается от данных у мышей с КИА (II группа) (табл. 4).

## Обсуждение

В основе механизмов развития ряда заболеваний человека, в том числе аутоиммунной природы (РА, болезнь Бехтерева, болезнь Крона, системная красная волчанка, полимиозит, дерматомиозит, псориаз, атопический дерматит и др.), лежит дисбаланс продукции провоспалительных цитокинов, среди которых наиболее значимым является TNF. С учетом роли цитокинов в механизмах развития этих заболеваний, проводится поиск лекарственных средств, способных не только ингибировать синтез и процессинг цитокинов, но и предотвращающих их взаимодействие с эффекторными клетками [17]. В клинической медицине достигнуты хорошие результаты лечения РА и болезни Крона методами анти-TNF-терапии с использованием препаратов, действующим началом которых является димерный химерный белок, сочетающий внеклеточный лиганд-связывающий домен клеточного TNF-рецептора I типа и Fc-фрагмент человеческого IgG1 [16] и гибридное моноклональное антитело сА2, состоящее из константного человеческого и варибельного мышинового доменов [30].

Ранее нами был выделен и охарактеризован новый тип TNF-антагониста – TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы

(VARV-CrmB) [7, 15]. Обнаружение этих свойств белка было основано на наблюдениях, свидетельствующих о том, что в процессе эволюции вирусом натуральной оспы были освоены различные механизмы преодоления иммунного ответа макроорганизма [35]. В частности, вирусный геном детерминирует синтез секретируемых белков – вироцепторов, имеющих структурное сходство с клеточными рецепторами цитокинов [32]. Вирусные белки функционируют как связывающие цитокины растворимые рецепторы, блокируя, таким образом, их активность. В дальнейшем был получен рекомбинантный бакуловирус, несущий ген TNF-связывающего белка VARV (VARV-CrmB) [1] и разработан метод его выделения [5]. Оказалось, что TNF-связывающий белок VARV обладает более выраженной TNF-нейтрализующей активностью в экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo* по сравнению с аналогичными белками вирусов оспы обезьян (MPXV) и оспы коров (CPXV) [25]. Кроме того, было установлено, что VARV-CrmB нейтрализует цитотоксическое действие рекомбинантного мышинового TNF и лимфотоксина- $\alpha$  в экспериментах с фибробластами линии L929 *in vitro* [27], а также оказывает выраженное лечебное действие в экспериментальной модели ЛПС-индуцированного эндотоксического шока у SPF мышей линии Balb/c, достоверно увеличивая процент выживших животных [25]. Однако эти результаты не позволяют создать истинное представление о биологическом потенциале VARV-CrmB. Поэтому в данной работе проведено углубленное изучение биологических свойств VARV-CrmB в модели экспериментального КИА, в патогенезе которого важнейшую роль играет TNF [37].

Развитие КИА сопровождается отеком лап с последующей деформацией суставов, которая приводит к нарушениям локомоторной функции мышей за счет деформации суставов и ограничения их подвижности [26]. Все эти изменения связаны с разрастанием соединительной ткани в суставах в результате воспалительной инфильтрации и первичного повреждения хрящевой ткани, о чем косвенно свидетельствует увеличение содержания с-ГАГ в сыворотке крови мышей с КИА. При введении белка VARV-CrmB и poly-Ab<sub>MuTNF</sub> происходит снижение отечности конечностей мышей и, судя по шкальной оценке, на ранних сроках исследования улучшаются клинические проявления КИА. При этом улучшение клинического состояния у мышей с КИА имеет более продолжительный характер при введении VARV-CrmB, чем при инъекции poly-Ab<sub>MuTNF</sub>. Однако к концу срока наблюдения во всех сравниваемых группах животных клинические прояв-

ления артрита по результатам шкальной оценки практически не различались.

При РА в синовиальной мембране суставов значительно увеличивается количество активированных нейтрофилов, В- и Т-лимфоцитов, тучных клеток, макрофагов, вовлеченных в процессы неоваскуляризации и лимфоангиогенеза. Осуществление рекрутинга, активации функций клеток, участвующих в развитии аутоиммунного воспалительного процесса при РА, происходит за счет участия широкого спектра цитокинов [23]. В наших исследованиях установлено снижение общего количества лейкоцитов крови на ранних сроках наблюдения (2 сут.), что, вероятно, связано с усилением миграции этих клеток из кровотока в ткани, а рост их численности к 7 сут. наблюдения, возможно, является результатом активации костномозгового кроветворения, о чем свидетельствуют данные результатов оценки костномозгового кроветворения. Подобные результаты были получены Rusten et al. [34], которые показали стимулирующий эффект TNF в концентрации 2 нг на рост КОЕ-ГМ.

TNF, взаимодействуя с клеточными рецепторами TNFRI (p55) и TNFRII (p75) [31], запускает каскад внутриклеточных реакций, в том числе модулирует окислительный метаболизм иммунокомпетентных клеток, с усилением продукции активных метаболитов кислорода (АМК) [4]. Высокая реакционная способность АМК определяет их токсичность для биологических систем на всех уровнях – от молекулярно-клеточного до организменного. Гиперпродукция TNF и АМК эффекторными клетками воспаления при массивной антигенной нагрузке и/или на фоне дефицита антиоксидантов приводит к разрушению клеток и тканей, в том числе суставов [6]. В наших исследованиях было выявлено усиление генерации АМК лейкоцитами крови мышей в динамике развития КИА. Генерация АМК лейкоцитами крови мышей в динамике развития КИА, возможно, была индуцирована стимулирующим действием цитокинов, в том числе и TNF. Введение poly-Ab<sub>MuTNF</sub> и VARV-CrmB мышам с КИА приводило к значительному снижению ХЛ ответа лейкоцитов крови. VARV-CrmB оказывал более выраженный ингибирующий эффект на продукцию АМК лейкоцитами крови мышей с КИА, чем poly-Ab<sub>MuTNF</sub>.

В исследованиях *in vitro* и на модели экспериментального остеоартрита Calich A.L. et al. [19] установили, что IL-1 и TNF $\alpha$  ухудшают метаболизм синовиальных тканей. Они стимулируют продукцию оксида азота и АМК, которые вовлечены в катаболизм хряща и, кроме этого, могут вызывать повреждение ДНК и апоптоз хондроцитов [20, 21]. Провоспалительные цитокины отвечают за повышенный синтез и экспрессию ма-

триксных металлопротеиназ в суставных тканях [14]. Очевидно, что усиление КАС крови в динамике развития КИА является результатом усиления синтеза матриксных металлопротеиназ, активности коллагеназы и протеаз, индуцированных провоспалительными цитокинами IL-1 и TNF $\alpha$  [12, 14]. После введения VARV-CrmB мышам с КИА наблюдали снижение КАС крови мышей с КИА, что, по сути, и является результатом его TNF-блокирующего действия.

TNF-нейтрализующая активность VARV-CrmB может быть связана с тем, что данный белок, наряду с N-концевым TNF-связывающим, содержит C-концевой SECRET-домен, обеспечивающий связывание вирусного белка с хемокинами. Возможно, что не только TNF-связывающая активность, но и хемокин-связывающие свойства VARV-CrmB важны для проявления нейтрализующего эффекта данного белка при септическом шоке [3], а также для угнетения продукции АМК лейкоцитами, индуцированными цитокинами и хемокинами, обнаруженными в нашем исследовании.

Таким образом, при введении VARV-CrmB мышам с КИА происходит снижение активности артрита, КАС и содержания гликозаминогликанов, численности нейтрофильных гранулоцитов и гранулоцитарных предшественников, ОМФ лейкоцитов крови на ранних сроках развития заболевания. Установлено, что белок VARV-CrmB обеспечивает более продолжительное улучшение клинического состояния мышей с КИА по сравнению с poly-Ab<sub>MuTNF</sub>. Полученные нами данные позволяют рассматривать рекомбинантный вирусный белок VARV-CrmB как эффективный TNF-антагонист. Однако, для пролонгирования терапевтического действия белка VARV-CrmB в модели КИА, по-видимому, необходимо изменение схемы эксперимента, а именно его введение не однократно, а курсами, соответственно фармакокинетики препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «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., Рязанкин И.А., Максютлов З.А., Тотменин А.В., Лебедев Л.Р., Нестеров А.Е., Агеев В.А., Щелкунов С.Н., Сандахчиев Л.С. Сравнительное изучение свойств ортопоксвирусных растворимых рецепторов фактора некроза опухолей // Доклады Российской академии наук. — 2003. — Т. 390. — С. 688-692.
2. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Непомнящих Т.С., Тотменин А.В., Максютлов 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, № 2. — С. 245-254.
3. 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, № 12. — С. 1664-1671.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимические и патофизиологические аспекты. — М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. — 343 с.
5. Лебедев Л.Р., Рязанкин И.А., Сизов А.А., Агеев 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.
6. Маянский Д.Н. Лекции по клинической патологии. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 464 с.
7. Насонов Е.Л. Моноклональные антитела к фактору некроза опухоли в ревматологии // Российский медицинский журнал. — 2003. — № 11. — С. 390-394.
8. Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Гилева И.П., Щелкунов С.Н. Болезни, обусловленные нарушением продукции TNF и IFN $\gamma$ , и современные подходы к их терапии // Успехи современной биологии. — 2007. — Т. 127, № 6. — С. 576-587.
9. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Диатроптова М.А., Насонов Е.Л. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. — 2010. — № 2. — С. 71-83.
10. Цырендоржиев Д.Д., Сенников С.В., Вязовая Е.А., Гилева И.П., 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 TNF // Бюллетень СО РАМН. — 2011. — № 3. — С. 73-79.
11. Цырендоржиев, Д.Д., Сенников С.В., Орловская И.А., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Гилева И.П., Щелкунов С.Н., Рязанкин И.А., Басова А.А., Козлов В.А. Влияние TNF-связывающего

белка вируса натуральной оспы на TNF-индуцированную окислительно-метаболическую активность и продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6 мононуклеарными клетками здоровых доноров // Иммунология. – 2011. – Т. 32, № 4. – С. 209-213.

12. Шараев П.Н., Пишков В.Н., Зворыгина Н.Г. Определение коллагенолитической активности плазмы крови // Лабораторное дело. – 1987. – № 1. – С. 60-62.

13. Шараев П.Н., Пишков В.Н., Соловьева Н.И. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях // Лабораторное дело. – 1987. – № 5. – С. 330-332.

14. Широков Л.Ю., Носков С.М., Папулия О.М., Козлова О.Г., Нагибин П.М., Долгова Л.Н. Роль цитокинов в патогенезе остеоартритов // Цитокины и воспаление. – 2010. – № 4. – С. 16-19.

15. Щелкунов С.Н., Сафронов П.Ф., Тотменин А.В., Рязанкина О.И., Петров Н.А., Гуроров В.В., Сандахчиев Л.С. Множественные гены белков семейства рецептора фактора некроза опухолей у вируса оспы коров. // Доклады Российской академии наук. – 1998. – Т. 360. – С. 702-705.

Ссылки 16-38 см. в References (стр. 523-524). See References for numbers 16-38 at pp. 523-524.

## References

1. Gileva I.P., Ryazankin I.A., Maksyutov Z.A., Totmenin A.V., Lebedev L.R., Nesterov A.E., Ageenko V.A., Shchelkunov S.N., Sandakhchiev L.S. Sravnitel'noe izuchenie svoystv ortopoksvirusnykh rastvorimyykh retseptorov faktora nekroza opukholey [A comparative study of the properties of orthopoxvirus soluble receptors of tumor necrosis factor]. *Doklady Rossiyskoy akademii nauk – Reports of the Russian Academy of Sciences, 2003, vol. 390, pp. 688-692.*

2. Gileva I.P., Ryazankin I.A., Nepomnyashchikh T.S., Totmenin A.V., Maksyutov Z.A., Lebedev L.R., Afinogenova G.N., Pustoshilova N.M., Shchelkunov S.N. Ekspressiya genov TNF-svyazyvayushchikh belkov ortopoksvirusov v kletkakh nasekomykh i izuchenie svoystv rekombinantnykh belkov [Gene expression of TNF-binding proteins orthopoxviruses in insect cells and to study the properties of recombinant proteins]. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular Biology, 2005, vol. 39, no. 2, pp. 245-254.*

3. Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Ryazankin I.A., Shchelkunov S.N. Rekombinantnyy TNF-svyazyvayushchiy belok virusa natural'noy ospy kak potentsial'nyy TNF-antagonist novogo pokoleniya [Recombinant TNF-binding protein of variola virus as a new generation potent antagonist of TNF $\alpha$ ]. *Biokhimiya – Biochemistry, 2009, vol. 74, no. 12, pp. 1664-1671.*

4. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shchikova E.B. Okislitel'nyy stress: Biokhimicheskie i patofiziologicheskie aspekty [Oxidative stress: Biochemical and pathophysiological aspects]. *Moscow, MAIK «Nauka/Interperiodika», 2001. 343 p.*

5. Lebedev L.R., Ryazankin I.A., Sizov A.A., Ageenko V.A., Odegov V.N., Afinogenova G.N., Shchelkunov S.N. Sposob ochistki antagonistov faktora nekroza opukholey i issledovanie ikh nekotorykh svoystv [The purification method of tumor necrosis factor antagonists and study some of their properties]. *Biotekhnologiya – Biotechnology, 2001, no. 6, pp. 14-18.*

6. Mayanskiy D.N. Lektsii po klinicheskoy patologii [Lectures on clinical pathology]. *Moscow, GEOTAR-Media, 2007. 464 p.*

7. Nasonov E. L. Monoklona'l'nye antitela k faktoru nekroza opukholi v revmatologii [Tumor necrosis factor monoclonal antibody in rheumatology]. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal – Russian Medical Journal, 2003, no. 11, pp. 390-394.*

8. Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Gileva I.P., Shchelkunov S.N. Bolezni, obuslovlennye narusheniem produktsii TNF i IFN $\gamma$ , i sovremennye podkhody k ikh terapii [Diseases caused by disturbance of production of TNF and IFN $\gamma$ , and current approaches to therapy]. *Uspekhi sovremennoy biologii – Advances in Modern Biology, 2007, vol. 127, no. 6, pp. 576-587.*

9. Novikov A.A., Aleksandrova E.N., Diatroptova M.A., Nasonov E.L. Rol' tsitokinov v patogeneze revmatoidnogo artrita [Role of cytokines in pathogenesis of rheumatoid arthritis]. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya – Scientific-Practical Rheumatology, 2010, no. 2, pp. 71-83.*

10. Tsyrendorzhiyev D.D., Sennikov S.V., Vyazovaya E.A., Gileva I.P., Ryazankin I.A., Lebedev L.R., Toporkova L.B., Kurilin V.V., Petukhova A.A., Orlovskaya I.A. Vliyaniye rekombinantnogo TNF-svyazyvayushchego belka virusa natural'noy ospy na migratsionnuyu i okislitel'no-metabolicheskuyu funktsiyu leykotsitov krovi myshey pri epikutannoy applikatsii TNF [Effect of recombinant TNF-binding protein of variola virus on migration and oxidation-metabolic function of the blood leukocytes of mice with skin applications TNF]. *Byulleten' SO RAMN – Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 2011, no. 3, pp. 73-79.*

11. Tsyrendorzhiyev, D.D., Sennikov S.V., Orlovskaya I.A., Kurilin V.V., Lopatnikova Yu.A., Gileva I.P., Shchelkunov S.N., Ryazankin I.A., Basova A.A., Kozlov V.A. Vliyanie TNF-svyazyvayushchego belka virusa natural'noy ospy na TNF-indutsirovannuyu okislitel'no-metabolicheskuyu aktivnost' i produktsiyu IL-1 $\beta$  i IL-6 mononuklearnymi kletkami zdorovykh donorov [Influence of TNF-binding protein of variola virus in TNF-induced oxidative metabolic activity and production of IL-1 $\beta$  and IL-6 mononuclear cells of healthy donors]. *Immunologiya – Immunology*, 2011, vol. 32, no. 4, pp. 209-213.
12. Sharaev P.N., Pishkov V.N., Zvorygina N.G. Opredelenie kollagenoliticheskoy aktivnosti plazmy krovi [Determination of collagenolytic activity of blood plasma]. *Laboratornoe delo – Laboratory Work*, 1987, no. 1, pp. 60-62.
13. Sharaev P.N., Pishkov V.N., Solov'eva N.I. Metod opredleniya glikozaminoglikanov v biologicheskikh zhidkostyakh [Method for determination of glycosaminoglycans in biological fluids]. *Laboratornoe delo – Laboratory Work*, 1987, no. 5, pp. 330-332.
14. Shirokov L.Yu., Noskov S.M., Papuliya O.M., Kozlova O.G., Nagibin P.M., Dolgova L.N. Rol' tsitokinov v patogeneze osteoartritov [Role of cytokines in pathogenesis of osteoarthritis]. *Tsitokiny i vospalenie – Cytokines and Inflammation*, 2010, no. 4, pp. 16-19.
15. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Gutorov V.V., Sandakhchiev L.S. Mnozhestvennye geny belkov semeystva retseptora faktora nekroza opukholey u virusa ospy korov [Multiple genes are a family of proteins, tumor necrosis factor receptor from cowpox virus]. *Doklady Rossiyskoy akademii nauk – Reports of the Russian Academy of Sciences*, 1998, vol. 360, pp. 702-705.
16. Bathon J.M., Martin R.W., Fleischmann R.M., Tesser J.R., Schiff M.H., Keystone E.C. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 2000, vol. 343, pp. 1586-1593.
17. Bazzoni F., Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.*, 1996, vol. 334, no. 26, pp. 1717-1725.
18. Calabrese L.H., Zein N., Vassilopoulos D. Safety of antitumour 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, pp. 18-24.
19. Calich A.L., Domiciano D.S., Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? *Clin. Rheumatol.*, 2010, vol. 29, no. 5, pp. 451-455.
20. Davies C.M., Gullak F., Weinberg J.B., Fermor B. Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, vol. 16, no. 5, pp. 624-630.
21. De Isla N.G., Stoltz J.F. *In vitro* inhibition of IL-1 $\beta$  catabolic effects on cartilage: a mechanism involved on diacerein anti-OA properties. *Biorheology*, 2008, vol. 45, no. 3-4, pp. 433-438.
22. El-Gabalawy H.D., Lipsky P.E. Why do we not have a cure for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002, vol. 4, no. 3, pp. 297-301.
23. Furst D.E., Breedveld F.C., Burmester G.R. Access to disease modifying treatments for rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.*, 1999, vol. 58, pp. 129-130.
24. Gartlehner G., Hansen R.A., Jonas B.L. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systemic review and metaanalysis. *J. Rheumatol.*, 2006, vol. 33, pp. 2398-2408.
25. Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.V. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *BBA – Proteins and Proteomics*, 2006, vol. 1764, pp. 1710-1718.
26. Hartog A., Hulsman J., Garssen J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2009, vol. 10, pp. 59-65.
27. Idriss H.T., Naismith J.H. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.*, 2000, vol. 50, pp. 184-195.
28. Inglis J.J., Notley C.A., Essex D. Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia: functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumor necrosis factor blockade. *Arthritis Rheum.*, 2007, vol. 56, pp. 4015-4023.
29. Kirou K.A., Mavragani C.P. TNF antagonists in the management of early rheumatoid arthritis: an overview. *Int. J. Adv. Rheumatol.*, 2006, vol. 14, pp. 49-56.
30. Knight D.M., Trinh H., Le J., Siegel S., Shealy D., McDonough M. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol. Immunol.*, 1993, vol. 30, pp. 1443-1453.

31. 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, vol. 4, suppl. 13, pp. 141-152.
32. McFadden G., Murphy P.M. Host-related immunomodulators encoded by poxviruses and herpesviruses. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, vol. 3, pp. 371-373.
33. Paul-Clark M.J., Mancini L., Del Soldato P., Flower R.J., Perretti M. Potent antiarthritic properties of a glucocorticoid derivative, NCX-1015, in an experimental model of arthritis. *Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, pp. 1677-1682.
34. 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, pp. 989-996.
35. 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, pp. 80-83.
36. Tono-Oka T., Ueno N., Matsumoto T. Chemiluminescence of whole blood. I. A simple and rapid method for the estimation of phagocytic function of granulocytes and opsonic activity in whole blood. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1983, vol. 26, pp. 66-75.
37. Turner J., Frank A.A., Brooks J.V., Marietta P.M., Orme I.M. Pentoxifylline treatment of mice with chronic pulmonary tuberculosis accelerates the development of destructive pathology. *Immunology*, 2001, vol. 102, pp. 248-253.
38. Weinblatt M.E., Keystone E.C., Furst D.E., Morelan L.W., Weisman M.H., Birbara C.A. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody for treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate the ARMADA trial. *Arthritis and Rheumatism*, 2003, vol. 48, pp. 35-45.