

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО TNF-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ НА МИГРАЦИОННУЮ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ МЫШЕЙ ПРИ ЭПИКУТАННОЙ АППЛИКАЦИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ

Дондок Дамдинович ЦЫРЕНДОРЖИЕВ¹, Сергей Витальевич СЕННИКОВ¹, Елена Алексеевна ВЯЗОВАЯ¹, Ирина Павловна ГИЛЕВА², Сергей Николаевич ЩЕЛКУНОВ², Игорь Александрович РЯЗАНКИН², Леонид Рудольфович ЛЕБЕДЕВ², Людмила Борисовна ТОПОРКОВА¹, Василий Васильевич КУРИЛИН¹, Алена Александровна ПЕТУХОВА¹, Ирина Анатольевна ОРЛОВСКАЯ¹

¹НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630091, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

²ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
630559, р. п. Кольцово, Новосибирская обл.

В статье представлены результаты изучения влияния рекомбинантного мышинного фактора некроза опухолей (гMu-TNF) и TNF-антагониста нового типа, TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы (VARV-CrmB), на миграционную и окислительно-метаболическую функции лейкоцитов мышей линии Balb/c. При эпикутанной аппликации гMu-TNF усиливает миграционную способность и интенсивность окислительного метаболизма лейкоцитов крови мышей. При этом установлено, что гMu-TNF кондиционирует (праймирует) лейкоциты, это проявляется в усилении продукции активных метаболитов кислорода (АМК) в ответ на дополнительный стимул — зимозан. Белок VARV-CrmB нейтрализует TNF-зависимую продукцию АМК лейкоцитами и нормализует их реактивность.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей, TNF-связывающий белок, активные формы кислорода, вирус натуральной оспы, лейкоциты.

Одним из ключевых коммуникативных медиаторов иммунных и воспалительных реакций организма человека и животных является фактор некроза опухолей (TNF). TNF, взаимодействуя с рецепторами цитоплазматической мембраны TNFRI (p55) и TNFRII (p75) [1], запускает каскад внутриклеточных реакций, в том числе модулирует окислительный метаболизм фагоцитирующих клеток. Высокая реакционная способность активных метаболитов кислорода (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 [2].

С учетом роли цитокинов в механизмах развития многих социально значимых заболеваний проводится поиск лекарственных средств, способных не только ингибировать их синтез и процессинг, но и предотвращать взаимодействие с эффекторными клетками [3]. Для создания лекарственных средств используются моноклональные антитела (Infliximab, Adalimumab) [4, 5] или рекомбинантные химерные белки, состоящие из TNF-рецепторных и иммуноглобулиновых доменов (Etanercept) [6].

Цырендоржиев Д.Д. — д.м.н., проф., вед.н.с. лаборатории иммунобиологии стволовой клетки; e-mail: tsdon@mail.ru

Сенников С.В. — д.м.н., проф., зав. лабораторией молекулярной иммунологии; e-mail: Sennikov_sv@mail.ru

Вязовая Е.А. — к.б.н., ст.н.с. лаборатории иммунобиологии стволовой клетки; e-mail: viazovaia@mail.ru

Гилева И.П. — к.б.н., вед.н.с. отдела геномных исследований

и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов; e-mail: gileva@vector.nsc.ru

Щелкунов С.Н. — д.б.н., проф., зав. отделом геномных исследований

и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов; e-mail: snshch@vector.nsc.ru

Рязанкин И.А. — к.б.н., н.с. отдела геномных исследований

и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов

Лебедев Л.Р. — к.б.н., ст.н.с. отдела конструирования биопрепаратов для медицины и ветеринарии

Топоркова Л.Б. — к.б.н., ст.н.с. лаборатории иммунобиологии стволовой клетки; e-mail: toporkova12@mail.ru

Курилин В.В. — к.м.н., ст.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии; e-mail: medinfo@ngs.ru

Петухова А.А. — аспирант лаборатории иммунобиологии стволовой клетки

Орловская И.А. — д.м.н., зав. лабораторией иммунобиологии стволовой клетки; e-mail: irorl@mail.ru

В настоящее время получены разрешения для практического применения таких TNF-блокаторов, как Remicade® (Centocor Inc., Malvern, США), Enbrel® (Immunex Corp., США), Humira™ (Abbott Laboratories, США), их действующим началом являются Infliximab, Etanercept и Adalimumab соответственно. Однако эти препараты не обладают универсальностью и противопоказаны больным с сердечно-сосудистыми заболеваниями [7], туберкулезом [8], латентными вирусными инфекциями [9].

Во многих научных центрах России также ведутся разработки оригинальных препаратов для системной блокады ключевых цитокинов, в том числе TNF. В частности, выделен и охарактеризован новый тип TNF-антагониста – TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы (VARV-CrmB) [10–12]. Авторами установлено, что, кроме эффективной TNF-нейтрализующей активности *in vitro*, VARV-CrmB оказывает выраженное лечебное действие в экспериментальной модели ЛПС-индуцированного эндотоксического шока у стерильных (specific pathogen free, SPF) мышей линии Balb/c, достоверно увеличивая процент выживших животных. Кроме того, показано, что рекомбинантный вирусный белок VARV-CrmB нейтрализует *in vitro* цитотоксическое действие rMu-TNF и лимфотоксина- α в экспериментах с мышиными фибробластами линии L929 [11]. Таким образом, установлено, что VARV-CrmB обладает TNF-нейтрализующей активностью как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако для уточнения механизмов TNF-нейтрализующего эффекта необходимы всесторонние исследования биологических свойств VARV-CrmB.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование влияния рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы VARV-CrmB на миграционную и окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов крови мышей линии Balb/c при эпикутанной аппликации TNF.

Материал и методы

Эксперименты проводили на мышах-самцах линии Balb/c массой 23–25 г. Животных содержали в стандартных условиях в виварии НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

В работе использовали рекомбинантный мышинный TNF (rMu-TNF), выделенный из бактериального штамма-продуцента [10], и белок VARV-CrmB, полученный по методу, описанному в работе [13].

Эпикутанную аппликацию rMu-TNF и VARV-CrmB на дорзальную поверхность обеих ушей мышей в объеме 25 мкл/ухо проводили по Cumberbatch M. et al. [14].

Животные были разделены на 4 группы: 1-я (контрольная) группа – эпикутанная обработка

фосфатным буфером (PBS) ($n = 8$), 2-я группа – эпикутанная аппликация rMu-TNF в дозе 500 нг/мышь ($n = 15$), 3-я группа – эпикутанное применение рекомбинантного VARV-CrmB в дозе 500 нг/мышь ($n = 15$), 4-я группа – эпикутанная аппликация 500 нг rMu-TNF и, спустя 30 мин, 500 нг VARV-CrmB ($n = 15$).

Животных выводили из эксперимента через 2, 24 и 72 ч после эпикутанной аппликации PBS, rMu-TNF и VARV-CrmB согласно правилам использования экспериментальных животных с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации.

Подсчет количества лейкоцитов периферической крови проводили при помощи гематологического анализатора PCE-90 (ERMA Inc., Япония).

Окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов крови оценивали по интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) [15] на мультимодальном планшетном ридере «LB 941 TriStar» («Berthold Technologies», Германия). Для оценки реактивности лейкоцитов добавляли суспензию дрожжевого полисахарида зимозана А (Sigma, США) в концентрации 5 мг/мл и рассчитывали индекс стимуляции как соотношение зимозан-индуцированной и спонтанной ХЛ. Регистрацию интенсивности ХЛ каждой пробы осуществляли ежеминутно в течение 20 мин. Результаты выражали в условных единицах (1 усл. ед. = количество импульсов, испускаемых 1 лейкоцитом за 20 мин).

Миграцию клеток из кожного эксплантата после аппликации мышам rMu-TNF определяли по методу Larsen et al. [16]. Суммарное количество клеток, мигрировавших из целого кожного лоскута (дорзальная поверхность уха), полученных через 2 и 24 ч после аппликации rMu-TNF и PBS (контроль), подсчитывали в камере Горяева через 24 ч культивирования.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты

Динамика изменения общего количества лейкоцитов крови. У животных контрольной группы общее количество лейкоцитов крови после аппликации PBS возрастало и через 72 ч увеличилось в 3,4 раза (табл. 1). При аппликации rMu-TNF наблюдали неуклонный рост числа лейкоцитов крови. Так, через 2 ч их содержание возрастало в 1,8 раза по сравнению с показателями контрольных мышей и достигало максиму-

Таблица 1

Общее количество лейкоцитов крови и их миграционная активность у мышей после аппликации белка VARV-Crmb rMu-TNF-обработанным животным

Группа животных	Количество лейкоцитов крови, $\times 10^6/\text{л}$			Количество мигрирующих лейкоцитов, $\times 10^3$		
	2 ч	24 ч	72 ч	2 ч	24 ч	72 ч
Контроль	$4,2 \pm 0,7$	$8,4 \pm 3,7$	$16,0 \pm 1,9$	$7,6 \pm 0,8$	$11,3 \pm 0,7$	$15,3 \pm 1,5$
rMu-TNF	$8,7 \pm 0,7^*$	$17,1 \pm 0,6^*$	$18,6 \pm 2,8$	$17,8 \pm 1,4^*$	$8,2 \pm 0,9$	$11,8 \pm 1,6$
VARV-Crmb	$7,0 \pm 0,5^*$	$18,1 \pm 0,9^*$	$12,5 \pm 3,7$	$8,0 \pm 1,7^{\#}$	$8,7 \pm 1,0$	$7,1 \pm 0,7^*$
rMu-TNF + VARV-Crmb	$2,9 \pm 0,3^{*,\#}$	$9,6 \pm 1,8^{\#}$	$15,2 \pm 1,5$	$11,7 \pm 1,1^{\#}$	$10,2 \pm 1,2$	$9,7 \pm 0,9$

Примечание: здесь и в табл. 2, на рис.: * — значения, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от величин соответствующих показателей контрольной группы, # — от величин соответствующих показателей мышей, обработанных rMu-TNF.

ма через 72 ч. Аппликация rVARV-Crmb также вызывала увеличение численности лейкоцитов крови мышей, но менее выраженное, чем применение rMu-TNF. В то же время аппликация rVARV-Crmb достоверно снижала количество лейкоцитов у rMu-TNF-обработанных мышей. Изменение численности лейкоцитов крови при аппликации как PBS, так и rVARV-Crmb может быть результатом стресс-реакции в ответ на проводимые манипуляции, при которой наблюдается выход клеток из депо, в том числе из костного мозга, вследствие усиления продукции эндогенного TNF.

Оценка миграционной активности лейкоцитов.

У мышей всех групп, за исключением животных, обработанных rVARV-Crmb, наблюдали усиление миграции лейкоцитов (табл. 1). При этом стоит отметить, что, по данным Larsen et al. [16], около

60 % мигрирующих клеток являются дендритными клетками. У животных контрольной группы суммарное количество лейкоцитов, мигрирующих из кожного лоскута дорзальной поверхности уха, постепенно возрастало (через 72 ч — в 1,9 раза). При аппликации rMu-TNF наблюдали волнообразный характер изменения миграции клеток: уже через 2 ч их количество резко возрастало (в 2,4 раза), через 24 ч снижалось до уровня контрольных величин, а затем несколько повышалось. При обработке мышей rVARV-Crmb величина исследуемого показателя не менялась. В то же время практически на всех сроках наблюдения rVARV-Crmb достоверно снижал количество мигрирующих лейкоцитов у rMu-TNF-обработанных мышей.

Исследование окислительно-метаболической функции лейкоцитов крови. Результаты иссле-

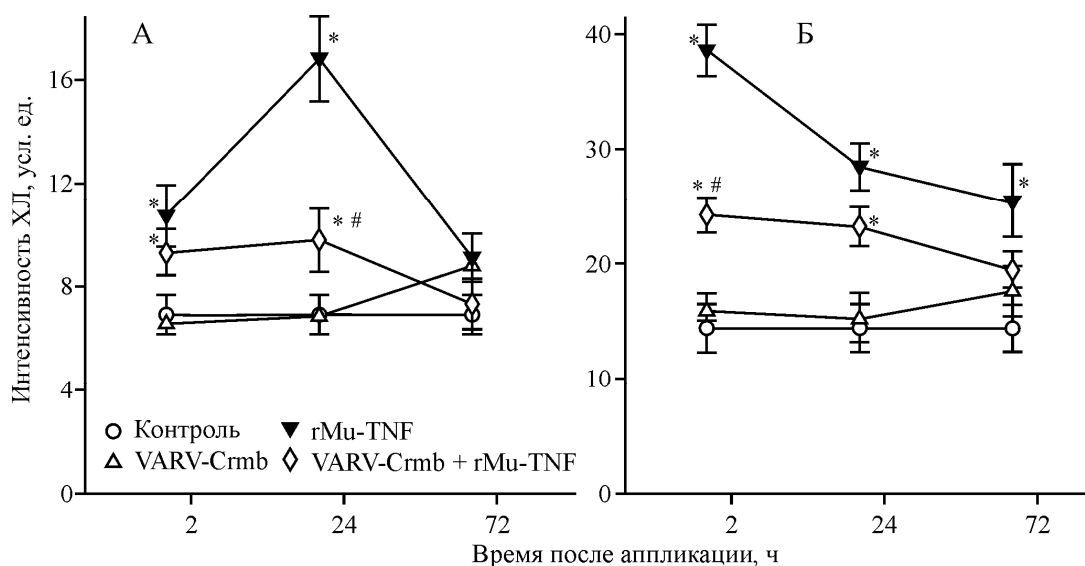


Рис. Изменение интенсивности спонтанной (А) и зимозан-индуцированной (Б) ХЛ лейкоцитов крови мышей после аппликации белка VARV-Crmb rMu-TNF-обработанным животным

дования ХЛ показали, что уже через 2 ч после эпикутанной обработки гМу-TNF активируется окислительный метаболизм лейкоцитов крови мышей, достигая максимума через 24 ч, а затем постепенно снижается до контрольных величин к 72 ч наблюдения (рис. 1А). В то же время через 2 и 24 ч после обработки мышей гVARV-CrmB интенсивность спонтанной ХЛ лейкоцитов крови не менялась, но через 72 ч возрастала по сравнению с контролем. При эпикутанной аппликации VARV-CrmB данный показатель, отражающий окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов крови мышей, обработанных гМу-TNF, значительно снижался, что свидетельствует о TNF-нейтрализующей способности белка.

Изменение реактивности лейкоцитов крови.

Результаты исследования показали, что при обработке мышей VARV-CrmB интенсивность зимозан-стимулированного ХЛ ответа лейкоцитов крови практически не отличалась от контрольных значений. В то же время на всех сроках наблюдения после эпикутанной аппликации гМу-TNF данный показатель у мышей значительно возрастал, а обработка этих животных VARV-CrmB приводила к его достоверному снижению (рис. 1Б). При этом наиболее выраженное усиление зимозан-индуцированного ХЛ ответа лейкоцитов наблюдали у мышей через 2 ч после эпикутанной аппликации гМу-TNF, а применение VARV-CrmB сопровождалось его уменьшением в 1,6 раза ($p < 0,05$).

Анализ результатов расчета индекса стимуляции показал, что белок VARV-CrmB не менял реактивности лейкоцитов крови мышей (табл. 2). Среди исследуемых групп животных, судя по данному показателю, максимально высокая реактивность лейкоцитов была выявлена у мышей через 2 ч после эпикутанной аппликации гМу-TNF, которая сохранялась на высоком уровне и через 24 ч, а к 72 ч не отличалась от значения контрольной группы. На всех сроках наблюдения ап-

пликативное применение VARV-CrmB приводило к нормализации реактивности лейкоцитов крови гМу-TNF-обработанных мышей.

Обсуждение

Для изучения влияния гМу-TNF на функциональное состояние лейкоцитов и оценки TNF-нейтрализующей способности белка VARV-CrmB в настоящей работе использовали эпикутанный аппликативный метод воздействия. Метод чрезкожной доставки лекарственных средств в составе мазей, гелей и других форм широко применяется в клинической практике с незапамятных времен. Кроме того, различные патогенные агенты, органические и неорганические соединения при контакте с кожей вызывают развитие воспалительных и иммунопатологических (аллергических) процессов не только в коже, но и во внутренних органах.

В наших исследованиях было выявлено, что при эпикутанной аппликации гМу-TNF происходит усиление миграционной способности и интенсивности окислительного метаболизма лейкоцитов мышей. Усиление миграции лейкоцитов в зону воздействия гМу-TNF может быть связано с активацией резидентных гистиоцитов, клеток Лангерганса, дендритных клеток, гранулоцитов, продуцирующих целый спектр хемотактических медиаторов, таких как лейкотриены C4, B4, D4, интерлейкины (IL-1 β , IL-6, IL-8 и т.д.), TNF и компоненты комплемента C3a, C5a [17]. В экспериментах с интрадермальным введением мышам гМу-TNF и гIL-1 β наблюдали усиление миграции клеток Лангерганса, а применение соответствующих моноклональных антител отменяло этот эффект [18]. При этом установлено, что характер миграционной активности клеток во многом зависит от концентрации цитокинов. Например, в экспериментах Stoitzner et al. [19] показано, что низкие дозы TNF- α (10–50 ЕД/мл) стимулируют миграцию дендритных клеток, а высокие (5000–10000 ЕД/мл) — снижают, что подтверждает гипотезу блокады рецепторов TNF- α [TNFRI (p55)

Таблица 2

*Индекс стимуляции лейкоцитов крови мышей
после аппликации белка VARV-CrmB гМу-TNF-обработанным животным*

Группы животных	Срок наблюдения (ч)		
	2	24	72
Контроль	2,07 \pm 0,27	2,07 \pm 0,27	2,07 \pm 0,27
гМу-TNF	3,60 \pm 0,18*	2,90 \pm 0,10*	2,80 \pm 0,34
VARV-CrmB	2,42 \pm 0,26 [#]	2,20 \pm 0,14 [#]	2,00 \pm 0,38
гМу-TNF + VARV-CrmB	2,60 \pm 0,18 [#]	2,37 \pm 0,15 [#]	2,70 \pm 0,25

и TNFRII (p75)] «запредельными» концентрациями этого цитокина.

Стимуляция окислительно-метаболической функции лейкоцитов крови при эпикутанной аппликации гMu-TNF происходит, возможно, при непосредственном его попадании в гемоциркуляцию. В научной литературе имеются противоречивые данные о действии TNF на окислительный метаболизм лейкоцитов. Результаты одних авторов свидетельствуют, что TNF не индуцирует продукцию активных метаболитов кислорода, другие исследования приводят доказательства прямой АМК-генерирующей способности TNF [2]. С другой стороны, не исключена возможность опосредованной активации окислительно-метаболической функции лейкоцитов крови под действием цитокинов, в том числе TNF, секретруемых резидентными фагоцитами в зоне аппликативного воздействия гMu-TNF, которые, в свою очередь, способствуют каскадному запуску продукции медиаторов лейкоцитами, обеспечивая высокий уровень TNF в циркулирующей крови.

В наших экспериментах выявлено изменение реактивности лейкоцитов крови при аппликативном воздействии гMu-TNF. Так, на дополнительную стимуляцию зимозаном лейкоциты крови мышей, полученные после эпикутанной аппликации (особенно через 2 ч) отвечают дыхательным взрывом, продуцируя значительно бóльшие количества АМК, что свидетельствует о развитии гиперреактивности этих клеток. При этом стоит отметить, что лейкоциты, полученные через 2 ч после аппликации VARV-CrmB, в данной системе генерировали АМК на уровне интактных клеток. Отсюда видно, что на данном этапе эксперимента лейкоциты находятся в состоянии кондиционирования (праймирования), а стимуляция зимозаном переводит их в состояние полной активации. В настоящее время принято считать, что для полной активации фагоцитов (нейтрофилов, моноцитов, макрофагов) требуется не менее двух последовательных событий: 1) праймирование и 2) активация. Классическим праймирующим агентом является IFN- γ , а разрешающим и/или стимулом, переводящим фагоциты в состояние полной активации – структурные молекулы микроорганизмов, например, липополисахариды грамотрицательных бактерий, а также цитокины, в том числе и сам по себе TNF [20].

В наших экспериментах показано, что аппликация белка VARV-CrmB мышам, предварительно обработанным гMu-TNF, приводит к снижению продукции лейкоцитами АМК и способствует нормализации их реактивности. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о TNF-нейтрализующей способности белка VARV-CrmB.

Снижение интенсивности окислительного метаболизма лейкоцитов TNF-обработанных мышей и отмена у них состояния праймирования под действием белка VARV-CrmB могут быть связаны с эффективной блокадой рецепторов к TNF на мембране лейкоцитов [11]. Кроме того, следует принять во внимание, что следствием эпикутанной аппликации гMu-TNF является увеличение концентрации не только TNF, но и других цитокинов и хемокинов (IL-8, IL-16), которые стимулируют продукцию АМК лейкоцитами крови. 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 взаимодействие вирусного белка с хемокинами. Возможно, что способность VARV-CrmB связывать не только TNF, но и хемокины важна для проявления нейтрализующего эффекта данного белка при септическом шоке [11], а также для угнетения продукции АМК лейкоцитами, индуцированными цитокинами и хемокинами, что в итоге приводит к нормализации их реактивных свойств.

Заключение

Таким образом, эпикутанная аппликация гMu-TNF усиливает миграционную способность и интенсивность окислительного метаболизма лейкоцитов мышей. При этом установлено, что гMu-TNF оказывает праймирующее влияние на лейкоциты крови мышей *in vivo*, следствием чего является усиление продукции АМК в ответ на дополнительную стимуляцию зимозаном. Белок VARV-CrmB эффективно нейтрализует TNF-индуцированную продукцию АМК лейкоцитами крови и нормализует их реактивность.

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. 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. 4. (Suppl. 13). 141–152.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимические и патофизиологические аспекты. М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.
3. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shchikova E.B. Oxidative stress: Biochemical and pathophysiological aspects. M.: MAIK Nauka/Interperiodica. 2001. 343 p.
4. Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Гилева И.П., Щелкунов С.Н. Болезни, обусловленные наруше-

нием продукции TNF и IFN γ , и современные подходы к их терапии // Успехи соврем. биологии. 2007. 127. (6). 576–587.

Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Gileva I.P., Shchelkunov S.N. Diseases caused by violation of the production TNF and IFN γ , and modern approaches to their therapy // Uspekhi Sovrem. biol. 2007. 127. (6). 576–587.

4. *Siegel S.A., Shealy D.J., Nakada M.T. et al.* The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality *in vivo* // Cytokine. 1995. 7. 15–25.

5. *Weinblatt M.E., Keystone E.C., Furst D.E. et al.* 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 Rheum. 2003. 48. 35–45.

6. *Bathon J.M., Martin R.W., Fleischmann R.M. et al.* A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis // N. Engl. J. Med. 2000. 343. 1586–1593.

7. *Lo E., Rezai K., Evans A.T. et al.* Why don't they listen? Adherence to recommendations of infectious disease consultations // Clin. Infect. Dis. 2004. 38. 1212–1218.

8. *Arend S.M., Breedveld F.C., van Dissel J.T.* TNF-alpha blockade and tuberculosis: better look before you leap // Neth. J. Med. 2003. 61. 111–119.

9. *Calabrese L.H., Zein N., Vassilopoulos 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. 63. (Suppl. 2). 18–24.

10. *Гилева И.П., Малкова Е.М., Непомнящих Е.С. и др.* Изучение действия TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы на развитие ЛПС-индуцированного эндотоксического шока // Цитокины и воспаление. 2006. (1). 44–49.

Gileva I.P., Malkova E.M., Nepomnyashchikh E.S. et al. The study of the TNF-binding protein of variola virus on the development of LPS-induced endotoxic shock // Cytokiny i vospalenie. 2006. (1). 44–49.

11. *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. 74. (12). 1664–1671.

Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Ryazankin I.A., Shchelkunov S.N. Recombinant TNF-binding protein of variola virus as a new generation potential TNF-antagonist // Biokhimiya. 2009. 74. (12). 1664 – 1671.

12. *Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V. et al.* Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different // Biochim. Biophys. Acta. 2006. 1764. 1710–1718.

13. *Лебедев Л.Р., Рязанкин И.А., Сизов А.А. и др.* Способ очистки антагонистов фактора некроза опухолей и исследование их некоторых свойств // Биотехнология. 2001. (6). 14–18.

Lebedev L.R., Ryazankin I.A., Sizov A.A. Method of cleaning and other antagonists of tumor necrosis factor and study some of their properties // Biotechnologiya. 2001. (6). 14–18.

14. *Cumberbatch M., Clelland K., Dearman R.J., Kimber I.* Impact of cutaneous IL-10 on resident epidermal Langerhans' cells and the development of polarized immune responses // J. Immunol. 2005. 175. 43–50.

15. *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. 26. (1). 66–75.

16. *Larsen C.P., Steinman R.M., Witmer-Pack M. et al.* Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants // J. Exp. Med. 1990. 172. 1483–1493.

17. *Маянский Д.Н.* Лекции по клинической патологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 464 с.

Mayanski D.N. Lectures on clinical pathology. M.: GEOTAR-Media, 2007. 464 p.

18. *Antonopoulos C., Cumberbatch M., Dearman R.J. et al.* Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact sensitization in mice // J. Immunol. 2001. 166. 3672–3677.

19. *Stoitzner P., Zanella M., Ortner U. et al.* Migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF- α and IL-1 β // J. Leukoc. Biol. 1999. 66. 462–470.

20. *Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д.* Активация макрофагов // Успехи соврем. биол. 1990. (3). 352–368.

Mayanskii D.N., Tsyrendorzhiev D.D. Activation of macrophages // Uspekhi sovrem. biol. 1990. (3). 352–368.

EFFECT OF RECOMBINANT TNF-BINDING PROTEINS OF VARIOLA VIRUS ALONG THE MIGRATORY AND OXIDATION-METABOLIC FUNCTIONS OF MICE BLOOD LEUKOCYTES AT THE APPLICATIONS RMU-TNF

Dondok Damdinovich TSYRENDORZHIEV¹, Sergey Vitalevich SENNIKOV¹,
Elena Alekseevna VYAZOVAYA¹, Irina Pavlovna GILEVA², Sergey Nikolaevich SCHELKUNOV²,
Igor Alexandrovich RYAZANKIN², Leonid Rudol'fovich LEBEDEV², Ludmila Borisovna TOPORKOVA¹,
Vasilii Vasil'evich KURILIN¹, Alena Alexandrovna PETUKHOVA¹, Irina Anatol'evna ORLOVSKAYA¹

¹*Institute of Clinical Immunology SB RAMS
630091, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14*

²*Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor
630559, Koltsovo, Novosibirsk region*

The influence of recombinant murine tumor necrosis factor (rMu-TNF) and a new type of TNF-antagonist, TNF-binding protein of variola virus (VARV-CrmB), on migration and oxidative-relatively metabolic (OM) function of Balb/c mice blood leukocytes has been studied. At the application, rMu-TNF enhances migration and oxidative metabolism of mice blood leukocytes and primes them increasing the release of reactive oxygen species in response to an additional stimulus – zymosan. VARV-CrmB protein neutralizes rMu-TNF-modulated reactive oxygen species release of leukocytes and normalizes their reactivity.

Key words: tumor necrosis factor, TNF-binding protein, reactive oxygen species, variola virus, white blood cells.

Tsyrendorzhiev D.D. – doctor of medical sciences, professor, leading researcher
of laboratory immunobiology of stem cell; e-mail: tsdon@mail.ru

Sennikov S.V. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory molecular immunology;
e-mail: Sennikov_sy@mail.ru

Viazovaia E.A. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory immunobiology of stem cells;
e-mail: viazovaia@mail.ru

Gileva I.P. – candidate of biological sciences, leading researcher of department genomic research
and development of methods of DNA diagnosis of poksviruses; e-mail: gileva@vector.nsc.ru

Schelkunov S.N. – doctor of biological sciences, head of department genomic research
and development of methods of DNA diagnosis of poksviruses; e-mail: snshchel@vector.nsc.ru

Ryazankin I.A. – candidate of biological sciences, researcher of department genomic research
and development of methods of DNA diagnosis of poksviruses

Lebedev L.R. – candidate of biological sciences, senior researcher of department designing biological products
for human and veterinary medicine

Toporkova L.B. – candidate of biological sciences, senior researcher laboratory immunobiology of stem cells;
e-mail: toporkova12@mail.ru

Kurilin V.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of laboratory molecular immunology;
e-mail: medinfo@ngs.ru

Petukhova A.A. – post-graduate student of laboratory immunobiology of stem cells

Orlovskaya I.A. – doctor of medical sciences, head of laboratory immunobiology of stem cells; e-mail: irorl@mail.ru