

15. Flaminio M.J., Borges A.S., Nydam D.V. et al. The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal // *J. Immune Based Ther. Vaccines*. 2007. No. 5. P. 18–23.
16. Gupta K., Cooper C. A Review of the Role of CpG Oligodeoxynucleotides as Toll-like Receptor 9 Agonist in Prophylactic and Therapeutic Vaccine Development in infectious Diseases // *Drugs in Rand D*. 2008. Vol. 9, No. 3. P. 137–145.
17. Hackett C.J. Innate immune activation as a broad-spectrum biodefence strategy: prospects and research challenges // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2003. Vol. 112. P. 686–694.
18. Jahrsdorfer B., Weiner G. CpG oligodeoxynucleotides as immunotherapy in cancer // *Cancer Therapeutics*. 2006. Vol. 3, No. 1. P. 27–32.
19. Jacob T., Walker P.S., Krieg A.M. et al. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing ODN of TH1 responses by immunostimulatory DNA // *J. Immunol*. 1998. Vol. 161. P. 3042–3049.
20. Jozsef L., Khreiss T., Filep J.G. CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes // *Faseb J*. 2004. Vol. 18. P. 1776–1778.
21. Kensuke M. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors // *Sem. Immunol*. 2007. Vol. 19. P. 3–10.
22. Kline J.N., Krieg A.M. Toll-like receptor 9 activation with CpG ODN for asthma therapy // *Drug News Perspect*. 2008. Vol. 21, No. 8. P. 434–439.
23. Klinman D., Shiota H., Tross D. et al. Synthetic ODN as modulator of inflammation // *J. of Leucocyte Biol*. 2008. Vol. 84. P. 958–964.
24. Krieg A.M. Antiinfective Application of Toll-like Receptor 9 Agonist // *The proceedings of the American Thoracic Society*. 2007. Vol. 4. P. 289–294.
25. Maletto B., Ropolo A., Moron V., Pistoiresi – Palencia M.C. CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged Balb/c mice // *Journ. of Leucocyte Biology*. 2002. Vol. 72. P. 447–454.
26. Park Y., Lee S.W., Sung Y.C. Cutting Edge: CpG-DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulation cellular inhibitor of apoptosis proteins, through the Phosphatidylinositol-3-OH kinase pathway // *J. Immunology*. 2002. Vol. 1, No. 168. P. 5–8.
27. Silverman E.S., Drzen J.M. Immunostimulatory DNA for Asthma // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2003. Vol. 28. P. 645–647.
28. Sparwasser T., Hultner L., Koch E.S. Immunostimulatory CpG-ODN cause extramedullary murine hemopoiesis // *J. Immunology*. 1999. Vol. 162. P. 2368–2374.
29. Tocunaga T., Yamamoto H., Shimada S. et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG // *J. Nat. Cancer Inst*. 1984. Vol. 72, No. 4. P. 955–962.
30. Yoshinaga T., Yasuda K., Ogawa Y. et al. DNA and its cationic lipid complexes induce CpG-motif-dependent activation of murine dendritic cells // *Immunology*. 2007. Vol. 120, No. 3. P. 295–302.
31. Verthelyi D., Klinman D.M. Immunoregulatory activity of CpG-ODN in humans and nonhuman primates // *Clin. Immunol*. 2003. Vol. 109. P. 64–71.
32. Wang H., Rayburn E., Zhang R. Synthetic ODN containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG-ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics // *Curr. Pharm. Des*. 2005. Vol. 11, No. 22. P. 2889–2997.
33. Wen-Ming-Chu., Dragoi A.M., Cong Cao, Wan Y. Mechanism of cell survival induced by CpG-DNA // *The FASEB J*. 2008. Vol. 22. P. 672–675.

Поступила в редакцию 27.03.2009.

#### ACTION OF PROKARYOTE'S DEOXYRIBONUCLEIC ACID ON HUMORAL AND CELLULAR FACTORS OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY OF VERTEBRATE ANIMALS

N.N. Besednova, T.S. Zaporozhets  
Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia)  
Summary — The paper gives due consideration to the effects of eukaryote's DNA, natural and synthetic oligodeoxynucleotides produced on humoral and cellular factors of innate and adaptive immunity, emphasizing the issues of DNA–Toll-like receptors interaction and innate immunity initiation. Imparting the information about immunostimulating, adjuvant and anti-infectious properties of the prokaryote's DNA, the authors highlight intensification of T-helper factor type-1 immune response that allows promising possibility to apply DNA and oligodeoxynucleotides for the treatment of allergic diseases, including bronchial asthma.

**Key words:** deoxyribonucleic acid, oligodeoxynucleotides, immunity, immune system.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 8–12.

УДК 616-006.04-085.37:577.213/217:[615.324:597.552.51]

Н.Н. Беседнова<sup>1</sup>, Л.Н. Федянина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

<sup>2</sup> Тихоокеанский государственный экономический университет (690091 г. Владивосток, Океанский пр-т, 19)

### ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

**Ключевые слова:** дезоксирибонуклеиновая кислота, олигодезоксинуклеотиды, опухоли, иммуностимуляторы.

Обзор нового перспективного направления в иммунотерапии злокачественных новообразований — применении экзогенной ДНК, обогащенной неметилированными CpG-мотивами, а также естественных и синтетических CpG-олигодезоксинуклеотидов. Приведены результаты совместного применения препаратов ДНК, химиотерапии и лучевой терапии. Излагаются материалы собственных исследований, посвященных эффективности ДНК из молок лососевых рыб в профилактике и комплексной терапии онкологических заболеваний.

В основе цитотоксического действия большинства современных химиотерапевтических препаратов ле-

жит повреждение ДНК. Так, ингибирующее действие на опухоли циклофосфана определяется индукцией множественных двухцепочечных разрывов в ДНК кроветворных клеток, приводящих к мутациям и хромосомным aberrациям и в итоге — к гибели клеток [11]. Исходя из этого, экзогенную ДНК, полученную из прокариот и эукариот, стали применять в комплексе базисной химиотерапии больных злокачественными новообразованиями с целью восстановления лейкопоза.

Препараты фрагментированной ДНК из эукариотических клеток (органов мышей или плаценты человека) обладают способностью стимулировать восстановление количества лейкоцитов в периферической крови мышей при угнетении гемопоэза

Беседнова Наталия Николаевна — академик РАМН, д-р мед. наук, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-14-38; e-mail: niem\_vl@mail.ru.

циклофосфаном [4]. Введение плацентарной ДНК мышам с внутримышечными трансплантатами лимфосаркомы приводит к выраженному торможению роста опухоли. Сочетание циклофосфана с ДНК вызывает более значительный противоопухолевый эффект, чем применение одного химиопрепарата. Лейкостимулирующий эффект наиболее сильно проявляется при использовании аллогенной или таксономически более близкой (мышинной) ДНК. Гомологическая рекомбинация происходит при нахождении гомологичных участков не по всей длине фрагмента, а только краевыми одноцепочечными «хвостами», на которых формируется комплекс Rad 51. Фрагменты экстраклеточной ДНК, попавшие в ядро, интегрируются в реципиентный геном по способу гомологической рекомбинации и таким образом «залечивают» те хромосомные дефекты, которые возникают вследствие обработки цитостатиком. Такой способ гомологического обмена внехромосомного материала ДНК и хроматина объясняет полученное в описанных экспериментах терапевтическое действие препаратов ДНК близких таксономических групп. Однако авторы допускают, что кратковременное воздействие гетерологичной ДНК вполне приемлемо при терапии миелодепрессий, вызванных применением алкилирующих агентов, и это может быть использовано в перспективе при химиотерапии злокачественных новообразований [4].

В плазме крови и межклеточной жидкости животных и человека содержится значительное количество деградировавшей геномной ДНК, и ее концентрация в крови увеличивается при наличии в организме злокачественной опухоли [17]. Эта ДНК поступает в кровь из нормальных и опухолевых клеток в свободном виде. В составе апоптотических телец она может поглощаться другими, живыми, клетками и попадать в ядро. По-видимому, транспортированные в клеточное ядро фрагменты экстраклеточной ДНК за счет механизма гомологической рекомбинации могут встраиваться в соответствующие участки хромосом и тем самым исправлять мутации или индуцировать генетические изменения в соответствии с источником фрагментов ДНК.

В.П. Николин и др. [4] исследовали влияние препаратов фрагментированной ДНК на рост перевиваемых опухолей у мышей. Авторы получали человеческую ДНК из плацент здоровых рожениц, а ДНК мышей — из смеси тканей и органов этих животных (печени, почек, селезенки, тимуса). Эксперименты были проведены на трех перевиваемых новообразованиях — опухоли Эрлиха, гепатоме ГА-1 и карциноме Льюиса. Было установлено, что препараты фрагментированной геномной ДНК обладают способностью в большей или меньшей степени тормозить рост этих опухолей и оказывают умеренное ингибирующее влияние на развитие опухолевых метастазов. Эту способность проявляют препараты ДНК, полученные как из тканей мышей, сингенных или аллогенных по

отношению к опухоленосителю, так и из ткани человека. Противоопухолевое действие ДНК В.П. Николин и др. [4] объяснили процессом гомологической рекомбинации, в результате которой происходит постоянный обмен фрагментами экстраклеточной ДНК с соответствующими гомологичными участками хромосом клеточного генома. Высказано предположение, что попавшая в клетки деградировавшая экстраклеточная ДНК может распознаваться ими как поврежденная, в результате чего запускается р53-зависимый путь задержки клеточного цикла с последующим апоптозом. Эксперименты были проведены на культуре фибробластов. Подобные механизмы могут иметь место и в опухолевых клетках при введении экзогенной ДНК [15].

ДНК прокариот является патогенассоциированным молекулярным паттерном и воспринимается иммунной системой позвоночных как чужеродный агент, что обусловлено наличием в ней неметилированных фрагментов CpG [6]. Аналогами бактериальной ДНК являются синтетические олигонуклеотиды (ОДН), содержащие CpG-мотивы. ДНК прокариот, а также естественные и синтетические ОДН являются иммуностимуляторами и агонистами толл-подобного рецептора-9 (Toll-Like Receptor – TLR) [6, 7]. Введение CpG-ДНК сопровождается активацией NK- и NKT-клеток, дендритных клеток, макрофагов и токсических Т-лимфоцитов [20].

Последовательность ОДН, особенности их остова, а также вид опухолевой модели оказывают влияние на специфику иммунобиологической активности CpG-ОДН относительно индуцируемого иммунного ответа. Так, было показано [14], что введение CpG-ОДН 1585 вызывает опосредованную NK-клетками регрессию меланомы, но не является эффективным при лимфоме. В то же время введение CpG-ОДН 1826 вызывало подавление роста лимфомы, опосредованное NK- и Т-клетками.

Противоопухолевый компонент бактериальной ДНК (ОК-432) — неметилированные CpG-мотивы из стрептококка — индуцировал активность Т-хелперов 1-го типа, повышал уровень цитокинов, продуцируемых этими клетками (γ-интерферон, фактор некроза опухоли-α, интерлейкины 12 и 18), увеличивал активность NK-клеток, активировал в экспериментах *in vitro* мононуклеары периферической крови [29]. Метилированные соединения такой способностью не обладали. Противоопухолевое действие комплекса авторы связывали с активацией TLR-9 CpG-мотивами стрептококка [14].

В экспериментальной иммунотерапии опухолей выделяют несколько стратегий применения активных фрагментов бактериальной ДНК: а) монотерапия CpG-ДНК, б) введение CpG-ДНК в составе ДНК-вакцин, в) использование CpG-ДНК в качестве адъюванта для повышения эффективности противоопухолевых вакцин или моноклональных антител и г) применение CpG-ДНК в качестве иммуностимулятора или

иммунопротектора при сопроводительной терапии [5]. Иммунотерапевтические эффекты CpG-ДНК могут состоять в выраженном торможении опухолевого роста, увеличении продолжительности жизни экспериментальных животных с опухолью, угнетении метастазирования, а также в полном отторжении первично трансплантированных опухолевых клеток или уже развившихся опухолевых узлов и повторно трансплантированных опухолей. Выраженность данных эффектов зависит от режима применения (профилактический или терапевтический), дозы, количества инъекций, количества трансплантированных опухолевых клеток, агрессивности онкологической модели, степени развития опухоли перед началом терапии CpG-ДНК и ее чувствительности к другим способам лечения [5].

В наших экспериментах *in vivo* на модели асцитной формы карциномы Льюиса у мышей было исследовано противоопухолевое действие ДНК, полученной из молок лососевых рыб [9]. Предварительно было установлено, что этот биополимер в широком диапазоне доз (0,2–200 мг/кг) не оказывает цитотоксического действия на клетки асцитной карциномы Льюиса в системе *in vitro*.

В экспериментах по изучению противоопухолевого действия ДНК использовали две дозы препарата – 10 и 100 мг/кг веса мыши и две схемы его введения – профилактическую и лечебную. Профилактическая схема: мышам за 7 дней до инокуляции опухоли вводили ежедневно подкожно ДНК, на 7-й день инокулировали клетки опухоли. Лечебная схема: мышам инокулировали клетки опухоли, а затем на протяжении 7 дней вводили ДНК. Контрольная группа мышей получала 0,85% раствор NaCl. Во всех экспериментах использовали неинбредных самцов весом 18–20 г. Животным внутривентрально вводили по 0,5 мл взвеси опухолевых клеток. Конечная доза опухолевых клеток составляла  $1\text{--}1,5 \times 10^6$  клеток на мышь. Каждая группа состояла из 7 мышей. Среднюю продолжительность жизни животных определяли общепринятым способом.

Было установлено, что ДНК из молок лососевых рыб увеличивает среднюю продолжительность жизни мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха, которая у нелеченных животных составляет обычно от 12 до 20 дней. В наших экспериментах в контрольной группе продолжительность жизни мышей составила  $10,0 \pm 0,6$  дня. В опытных группах она была значительно больше и зависела от дозы и схемы введения ДНК. Максимальный и достоверный противоопухолевый эффект (увеличение средней продолжительности жизни на 37,2%) наблюдался при профилактической схеме с дозой 10 мг/кг. При введении препарата в дозе 100 мг/кг как по лечебной, так и по профилактической схемам продолжительность жизни мышей увеличивалась не столь значительно (на 18,6 %).

Несмотря на высокую активность CpG-ДНК как В-клеточного митогена, она не способствует раз-

витию лимфомы у трансгенных мышей, являющихся моделью лимфомы Беркитта. В этой модели, напротив, CpG-ОДН полностью предотвращало развитие лимфомы. Установлена эффективность внутриопухолевого введения CpG-ОДН в комбинации с химиотерапией [24]. Важным фактором, определяющим противоопухолевую эффективность CpG-ДНК, служит продукция интерферона 1-го типа при стимуляции и костимуляции Т-лимфоцитов [21].

Новым направлением в противоопухолевой терапии является использование дендритных клеток, обработанных CpG-ОДН. Так, дендритные клетки, обработанные CpG-ОДН 1826, оказывали антиопухолевое действие в экспериментах на клеточной линии мышинной лимфосаркомы [13]. При этом усиливался цитотоксический эффект лимфоцитов и значительно уменьшались размеры опухоли.

На модели эмбриональной рабдомиосаркомы было исследовано комбинированное действие системного применения CpG-ДНК и циклофосфида или топотекана [31]. Введение CpG-ДНК совместно с циклофосфаном повышало выживаемость мышей по сравнению с таковой в случае введения только циклофосфана (70% против 41%). CpG-ДНК в комплексе с топотеканом увеличивала выживаемость животных с объемными новообразованиями. Необходимыми условиями регрессии опухоли были: наличие TLR-9 на клетках опухоли либо в организме на других клетках; индукция цитотоксических Т-лимфоцитов в иммунном ответе; введение CpG в регион опухоли. Такой подход является привлекательным, учитывая, что CpG-ОДН уже применяются в клинике и имеют хорошую репутацию в качестве противоопухолевых препаратов. В клинической практике также отмечены положительные результаты использования ДНК и ее комплексов с противоопухолевыми препаратами.

Безусловно, что химиотерапевтические препараты проявляют более выраженные противоопухолевые эффекты по сравнению с различными агентами, стимулирующими или модулирующими противоопухолевый иммунный ответ. Однако, угнетая и убивая трансформированные, активно пролиферирующие опухолевые клетки, цитостатики, к сожалению, вызывают серьезные повреждения неопухолевых элементов, особенно гемопоэтических клеток костного мозга, что влечет за собой выраженную иммуносупрессию. CpG-ДНК является сильным иммуностимулятором и, помимо активации различных иммунокомпетентных клеток, способна индуцировать экстрамедуллярный гемопоэз, а также повышать цитотоксическую активность Т-лимфоцитов у облученных мышей. Кроме того, применение CpG-ДНК индуцирует гораздо меньше побочных эффектов, чем цитостатики или такие препараты, как  $\gamma$ -интерферон и интерлейкин-12. Поэтому применение CpG-ДНК в качестве средства сопроводительной терапии для уменьшения иммуносупрессирующего влияния цитостатиков или лучевой терапии на сегодня рассмат-

ривается как весьма перспективное направление в онкологии [5].

Изучена возможность применения CpG-ДНК в сочетании с лучевой терапией в эксперименте. Применение CpG-ОДН значительно усиливало эффект лучевой терапии, приводило к существенному увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных. Полученные данные свидетельствуют о значительном потенциале CpG-ДНК для улучшения результатов лучевой терапии больных онкологического профиля [5].

Обнаружено, что различные CpG-ДНК по-разному действуют на факторы врожденного иммунитета [14]. Так, олигодезоксинуклеотид 1585 стимулировал активность НК-клеток и в незначительной степени индуцировал синтез цитокинов Т-хелперами 1-го типа. Этот препарат вызывал регрессию меланомы у мышей. Такого эффекта авторы не наблюдали у препарата, оказывающего стимулирующее воздействие на синтез цитокинов Т-хелперами 1-го типа. Эти материалы свидетельствуют о том, что необходим тщательный анализ особенностей клеточной специфичности различных препаратов CpG-ДНК и понимание клеточных механизмов, ответственных за противоопухолевую активность, тем более что в настоящее время предлагается достаточно много препаратов ДНК и CpG-ОДН.

Н. Wang et al. [30] сообщили о противоопухолевом действии нового иммуномодулирующего олигонуклеотида, который они комбинировали с моноклональными антителами и применяли на трех моделях рака молочной железы. Даже невысокие дозы ОДН подавляли рост опухоли MCF-7 не менее чем на 40%. В тех же случаях, когда препарат комбинировали с моноклональными антителами, эффект составлял около 96%. Эффективность комбинации моноклональных антиопухолевых антител с CpG-ДНК в опытах *in vivo* установили также В. Jahrsdorfer и G. Weiner [20]. В случае введения мышам только противоопухолевых моноклональных антител опухоли развивались у 90% животных. При инокуляции мышам моноклональных противоопухолевых антител и CpG-ОДН опухоли регистрировались только у 20% животных. Результаты *in vitro* были лучше при обработке спленоцитов неметилированными CpG, чем метилированными. При этом существенно повышались показатели антителозависимой клеточной цитотоксичности.

Даже однократное введение CpG-ОДН в мочевой пузырь мышей с развившимся раком этого органа уменьшало размеры опухоли [18]. При гистологическом исследовании препаратов, полученных из области опухоли, обнаруживалась обширная инфильтрация ткани макрофагами и лимфоцитами. У контрольных животных (получивших или физиологический раствор, или нестимулирующие CpG-ОДН) вес мочевого пузыря не уменьшался, при гистологическом исследовании имела место только очень слабая инфильтрация тканей лейкоцитами. Основываясь

на результатах этих экспериментов, авторы считают перспективным применение CpG-ОДН при раке мочевого пузыря, так как даже только введение биополимера уменьшает размеры опухоли.

На модели фибросаркомы Meth A, растущей подкожно у мышей линии Balb/c, было показано, что многократные введения MY-1 в растущую опухоль индуцировали через 4 дня ее инфильтрацию гетерогенной популяцией мононуклеаров, состоящей из естественных киллеров и макрофагов, а через 21 день – регрессию опухоли в результате реакции гиперчувствительности замедленного типа [23]. Терапевтический эффект вводимого в опухоль препарата MY-1 обусловлен его иммуотропным действием, что подтверждается экспериментами *in vivo*. Эффект его был хуже в случае прививки фибросаркомы Meth A бестимусным мышам nude, чем в случае ее прививки нормальным мышам Balb/c, что свидетельствует о причастности иммунной системы к процессам экспериментального канцерогенеза. Это было подтверждено также опытами *in vitro*: при воздействии на лимфоциты периферической крови больных различными злокачественными и доброкачественными новообразованиями MY-1 стимулировал продукцию фактора, активирующего макрофаги. [23].

Введение синтетических ОДН – агонистов TLR-9 в область опухоли у пациентов с базально-клеточной карциномой, а также кожной или подкожной меланомой приводило к полной или частичной регрессии опухолевого роста, повышению уровня интерлейкинов 6 и 12p40,  $\gamma$ -интерферона и фактора некроза опухоли- $\alpha$  [19].

Длительное, с 10-дневными интервалами, системное введение CpG-ОДН трансгенным мышам со спонтанным раком молочной железы снижало число метастазов в легких. Как и многие другие исследователи, авторы объясняли эффект CpG-ОДН повышением показателей врожденного иммунитета под влиянием биополимера [26].

О подавлении развития метастазов при применении CpG-ОДН сообщали Н.С. Cho et al. [16], которые использовали в работе модели мышинной меланомы B16 F10 и рака толстой кишки CT26. Системное применение CpG после инъекции клеток меланомы подавляло колонизацию легких злокачественными клетками. Такие же результаты получены на второй модели. Авторы полагают, что применение CpG-ОДН может быть эффективным для предотвращения развития метастазов после хирургических вмешательств.

ОДН оказывают прямое проапоптотическое действие на клетки рака простаты мышей – клеточную линию RM-1. Эффект зависит от дозы стимулятора. При этом ОДН активирует каспазный путь и снижает активность факторов транскрипции AP-1 и NF- $\kappa$ B. Оптимальной проапоптотической активностью обладают polyG-последовательности. ОДН, содержащие CpG и polyG, более эффективны, так как оказывают и прямое противоопухолевое,

и иммуностимулирующее действие [27]. Комбинация CpG-ОДН с антимикробным пептидом из семейства кателицидинов LL-37 значительно повышает пролиферативную и функциональную активность НК-клеток мышей, а также выживаемость животных, больных раком яичников. Применение только CpG-ОДН или только пептида LL-37 менее эффективно.

Выраженный адъювантный эффект CpG-ОДН отмечен при иммунизации мышей вакциной, включающей в себя раково-эмбриональный антиген (ТАТ-СЕА) и рекомбинантный белок HIV TATRTD области с CpG, а также только ТАТ-СЕА и CpG-ОДН (ТАТ-СЕА+CpG). Наблюдалось повышение СЕА-специфического иммунитета, связанного с активностью цитотоксических лимфоцитов и  $\gamma$ -интерферона, секретируемого Т-лимфоцитами. При этом в случае использования CpG-ОДН эти показатели были заметно выше. Вакцинация комплексом ТАТ-СЕА-CpG приводила к формированию Т-хелперного 1-го типа иммунного ответа, причем соотношение антител иммуноглобулинов G2a и G1 у таких животных было выше, чем в случае использования только одной вакцины [28].

В последние годы активно развивается новое направление в противоопухолевой терапии — применение липидных наночастиц в качестве носителей CpG-ДНК и CpG-ОДН. CpG-ОДН в комплексе с липосомными наночастицами усиливает адъювантный эффект при иммунизации мышей опухоассоциированными антигенами и повышает показатели врожденного и приобретенного иммунитета [22].

М.М. Whitmore et al. [32] разработали модель, в которой мышам внутривенно вводили комплекс, состоящий из холестероловых катионных липосом, протамина сульфата и некодируемой плазмидной ДНК. Такая комбинация приводила к повышению активности НК-клеток и увеличению синтеза цитокинов Т-хелперами 1-го типа.

Как известно, химиотерапия наряду с хирургическим и лучевым воздействием является важнейшим направлением лечения онкологических больных. Перспективы этого направления исследований достаточно значительны, особенно в лечении неоперабельных и метастатических новообразований. В настоящее время широко используют более 50 различных по механизму действия средств химиотерапии, десятки их сегодня проходят стадии апробации и отбора. Одним из перспективных препаратов является полиплатинен, фармакологические свойства которого обусловлены биологической активностью входящих в его состав активных компонентов: цис-платины и ДНК, которые вступают в химическое взаимодействие. В результате этого образуется конъюгат с концентрацией 1,4–1,5 мг/мл, представляющий собой систему направленного транспорта препарата платины в опухоль. Полиплатинен преимущественно накапливается в клетках опухоли, выводится, главным образом, через кишечник (отсюда отсутствие нефротоксичности) и не угне-

тает костно-мозговое кроветворение. Препарат наиболее эффективен при лечении онкологических заболеваний печени, легкого, яичника, желчного пузыря, кишечника, желудка и поджелудочной железы, костей и мягких тканей, канцероматоза брюшины и плевры. У 55% больных его применение вызывает стойкую ремиссию, а у 35% — стабилизацию процесса. Увеличивается продолжительность (в 2–3 раза по сравнению с контрольной группой) и улучшается качество жизни, устраняются боли и проявления эндогенной интоксикации, повышается аппетит [12].

Введение смеси дерината (натриевой соли ДНК молок осетровых рыб) и антрациклинового антибиотика больным с запущенными новообразованиями брюшной полости позволило снизить токсичность антибиотика и обеспечило возможность уменьшения его курсовой дозы с 300 до 50 мг [3].

Клинические испытания, проведенные у больных с острым миелолейкозом, показали, что комплексы ДНК из молок сельди с даунорубицином и с доксорубицином оказывали менее выраженное тромбоцитопеническое и кардиотоксическое действие, чем сами химиопрепараты, индуцировали большую продолжительность ремиссий и большую выживаемость больных. ДНК из бычьего тимуса в комплексе с доксорубицином индуцировала ремиссию подобного заболевания с такой же частотой, как и более токсичная комбинация из трех химиопрепаратов (митоксантрон+этопозид+цитозар) [8].

Деринат показал достаточно высокую эффективность при лимфогранулематозе. Дети с выраженной лейкопенией (от 200 до 1500 клеток в 1 мм<sup>3</sup> крови), возникшей в результате полиохимиотерапии, получали инъекции дерината. На 2-й день после его введения число лейкоцитов увеличивалось в 2,5–4 раза, что позволило продолжить интенсивную противоопухолевую терапию без перерыва и коррекции доз химиопрепаратов. Включение соли ДНК-натрия из молок осетровых рыб в комплекс лечения больных лимфогранулематозом позволило сократить в два раза время пребывания больных в стационаре [2].

Препараты ДНК рекомендованы практически всем пациентам, получающим химио- или лучевую терапию, для стимуляции гемопоэза, снижения кардио- и миелотоксичности препаратов. Успех в терапии онкозаболеваний объясняют способностью ДНК накапливаться в тканях, находящихся в критическом состоянии, и служить проводником цитостатика [2].

М. Okamoto и М. Sato [25] установили, что клетки микобактерий, убитые нагреванием и суспензированные в минеральном масле, являются сильным иммуноадъювантом. Активная фракция этого препарата BCG-CWS усиливала цитотоксическую активность Т-клеток и макрофагов по отношению к раковым клеткам и оказывала противоопухолевое действие *in vivo* на мышках и крысах с трансплантированными и спонтанными опухолями. Клинические испытания были выполнены на пациентах с различными типами злокачественных

опухолей. Как показали исследования, под действием этого препарата увеличивался срок выживаемости пациентов, особенно больных раком желудка и легких. При этом было установлено, что BCG-CWS оказывает антиопухолевый эффект путем воздействия на TLR-2 и TLR-4. Этот препарат активирует созревание дендритных клеток и продукцию ими фактора некроза опухоли. Через TLR-2 осуществляется индукция провоспалительного сигнала на макрофаги.

Противоопухолевый иммунный ответ, регистрируемый после введения CpG-ДНК, характеризуется преимущественно активацией NK-клеток, макрофагов и цитотоксических Т-лимфоцитов, а эффективность проводимой иммунотерапии коррелирует с антигенностью опухоли. Согласно результатам гистологических исследований, введение CpG-ДНК приводит к массивной инфильтрации опухолевого узла Т-лимфоцитами и макрофагами, за счет цитотоксического влияния которых преимущественно и происходит уничтожение отдельных опухолевых клеток и разрушение опухоли в целом [5]. Иммуностимуляция CpG-ДНК также влияет на микроокружение опухоли. При этом, действуя как противовоспалительный стимул, CpG-ДНК повышает экспрессию молекул адгезии на клетках эндотелия и тем самым способствует проникновению эффекторных клеток в ткань новообразования.

Целесообразность иммунореабилитации после удаления опухоли значительно увеличивается, что объясняется, как минимум, двумя важными обстоятельствами. Во-первых, применением лучевой и химиотерапии, к которым иммунная система особенно чувствительна. Как правило, следствие такой чувствительности — ослабление функций иммунокомпетентных клеток, обеспечивающих защиту организма, что приводит к различным осложнениям, прежде всего разнообразным инфекциям. Во-вторых, иммунотерапия и иммунореабилитация могут иметь большое значение для профилактики метастазов. Последнее объясняется хорошо известным фактом, согласно которому эффективность лизиса опухолевых клеток зависит от их соотношения с клетками-киллерами. В условиях активной опухолевой прогрессии такие соотношения складываются не в пользу киллерных клеток даже при сохранении их функциональной активности. После удаления опухоли такие соотношения изменяются и создаются оптимальные условия для лизиса оставшихся опухолевых клеток [1].

Нами было изучено действие биологически активной добавки к пище на основе ДНК из молок лососевых рыб на показатели системы цитокинов и гемопоэза у больных раком молочной железы с удаленной опухолью и получавших лучевую терапию [10]. Выбор этой категории лиц не случаен. Больные раком молочной железы, поступающие в радиологическое отделение для проведения стандартного курса послеоперационной лучевой терапии, получали хирургическое и/или химиотерапевтическое лечение 2–3

месяца назад. При поступлении в диспансер чувствовали себя удовлетворительно и имели практически нормальную картину периферической крови. У них, таким образом, было минимизировано влияние опухолюсоставляющего компонента и основное воздействие, под влиянием которого изменялись показатели иммунного статуса — лучевая и ДНК-терапия в качестве средства сопровождения.

Изучали уровень и динамику интерлейкина-3, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора — ранних гемопоэтических цитокинов, фактора некроза опухоли- $\alpha$  — провоспалительного цитокина,  $\gamma$ -интерферона и интерлейкина-10 — маркерных цитокинов Т-хелперного 1-го и 2-го типов ответа соответственно. Анализ динамики уровня цитокинов проводили в зависимости от начального их уровня: с исходно низкими, с исходно высокими и исходно средними значениями.

ДНК в качестве средства сопровождения лучевой терапии при раке молочной железы оказывала модулирующее действие в отношении уровня всех исследованных цитокинов. Однако в большей степени и статистически значимо изменялся в сторону увеличения уровень гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора у лиц с исходно низким его уровнем. ДНК повышала концентрацию  $\gamma$ -интерферона и фактора некроза опухоли- $\alpha$  у больных с низкими показателями, снижала уровень интерлейкина-10 при исходно высоких значениях.

При применении биологически активной добавки с ДНК не было установлено каких-либо побочных эффектов (как немедленных, так и отсроченных) и значимых изменений биохимических показателей крови и мочи, что свидетельствует о безопасности этого биорегулятора в отношении функции печени и почек.

Эксперименты показали, что в действии ДНК доминирует способность стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов и цитокинов, обеспечивающих иммунный ответ по Т-хелперному 1-му типу, что обеспечивает повышение показателей врожденного иммунитета. С учетом всех положительных аспектов действия ДНК из молок лососевых рыб, ее практическое применение начинает занимать одно из ведущих мест в общем арсенале современных средств иммунотерапии и иммунореабилитации пациентов с онкозаболеваниями.

Таким образом, включение иммуностимулирующей CpG-ДНК, а также естественных и синтетических ОДН в комплексную терапию онкологических заболеваний обосновано значимостью иммунных механизмов при данной патологии и в ряде случаев прямым противоопухолевым эффектом препаратов. Разрабатываются новые подходы к терапии при помощи нуклеиновых кислот, создаются иммобилизованные формы ДНК. В ближайшие годы ученые, по-видимому, смогут широко внедрить в клинику метод, основанный на введении онкологическим больным дендритных клеток, обработанных CpG-ДНК и ОДН.

Терапия с помощью ДНК из про- и эукариотических клеток является мощным резервом лечения больных злокачественными новообразованиями.

#### Литература

1. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Система интерлейкинов и рак. Киев: ДИА, 2000. 224 с.
2. Каплина Э.Н. Некоторые итоги клинического применения препарата деринат с 1976 по 2000 г. // Использование препарата деринат в различных областях медицины: тез. докл. 1-й Всероссийской научно-практ. конф. М., 2000. с. 47.
3. Мельников Д.Ю. Применение иммуноконъюгатов дерината в химиотерапии онкологических больных // Там же С. 6–8.
4. Николин В.П., Попова Н.А., Себелева Т.Е. и др. Влияние экзогенной ДНК на рост экспериментальных опухолей // Вопросы онкологии. 2006. Т. 52, № 1. С. 66–69.
5. Олишевский С.В., Козак В.В., Яниш Ю.В. и др. Иммуномодулирующий CpG-ДНК: перспективы клинического применения в онкологии // Онкология. 2006. Т. 8, № 2. С. 209–217.
6. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В. и др. Биологическая безопасность. М.: Медицина. 2006. 304 с.
7. Пак В.Г., Олиферук Н.С., Будихина Ф.С., Пинегин Б.В. Влияние естественных и синтетических CpG-мотивов на бактерицидность, НК-литическую активность, индукцию IL-12 и IFN- $\gamma$  in vitro // Иммунология. 2005. № 6. С. 332–335.
8. Пашук Л.К., Апрышко Г.Н., Трещалина Е.М. Препараты ДНК как потенциальные терапевтические средства // Хим.-фармац. журн. 1995. Т. 29, № 6. С. 61–64.
9. Федянина Л.Н., Беседнова Н.Н., Аминин Д.Л. и др. Изучение противоопухолевой активности ДНК из молок лососевых рыб и некоторых ее механизмов в эксперименте // Дальневосточный мед. журн. 2006. № 3. С. 59–62.
10. Федянина Л.Н. Иммуномодулирующая активность низкомолекулярной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из молок лососевых рыб (фундаментальные и прикладные аспекты): дис. ... д-ра мед наук. Владивосток. 2007. 320 с.
11. Якубов Л.А., Петрова Н.Н., Попова Н.А. и др. Роль экстракционной ДНК в поддержании постоянства и изменчивости клеточных геномов // ДАН. 2002. Т. 382. С. 406–410.
12. Яценко Л.Д. Химиотерапия неоперабельных опухолей органов грудной и брюшной полости // Онкология. 2007. Т. 9, № 1. С. 75–79.
13. Arab S., Motamedi M., Khansari N. et al. Dendritic cell Maturation with CpG for tumor Immunotherapy // Iran. J. Immunol. 2006. Vol. 3, No. 3. P. 99–105.
14. Ballas L., Krieg A.M., Warren T. et al. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxy nucleotides with distinct CpG motifs // J. Immunol. 2001. Vol. 67. P. 4878–4886.
15. Bergsmedh A., Szeles A., Spetz A.L. et al. Loss of the p21 (Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA // Cancer Res. 2002. Vol. 62, No. 2. P. 575–579.
16. Cho H. Ch., Kim B.H., Kim K. et al. Cancer immunotherapeutic effect of novel CpG ODN in murine tumor model. Intern. Immunopharmacology // 2008. Vol. 8, No. 10. P. 1401–1407.
17. Garcia-Olmo D.C., Gutierrez-Gonzales L., Ruiz-Piqueras R. et al. Detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma during tumor progression in rats // Cancer Lett. 2005. Vol. 217, No. 1. P. 115–123.
18. Hegele A., Dalpke A., Heeg K. et al. Immunostimulatory CpG Oligodeoxynucleotides Reduce Tumor Burden After Intravesical Administration in an Orthotopic Murine Bladder Cancer Model // Tumor Biol. 2005 Vol. 26. P. 274–280.
19. Hofmann M.A., Kors Ch., Audring H. et al. Phase I Evaluation of Intralesionally injected TLR9 – agonist PF-3512676 in Patients with Basal cell Carcinoma or Metastatic Melanoma // J. of Immunotherapy: abstract. 2008. Vol. 31, No. 5. P. 520–527.
20. Jahrsdorfer B., Weiner G. CpG oligodeoxynucleotides as immunotherapy in cancer // Cancer Therapeutics. 2006. Vol. 3, No. 1. P. 27–32.
21. Jacob T., Walker P.S., Krieg A.M. et al. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG – containing ODN of Th1 responses by immunostimulatory DNA // J. Immunol. 1998. Vol. 161. P. 3042–3049.
22. Jong de S., Chikh G., Sekirov L. et al. Encapsulation in liposomal nanoparticles enhances the immunostimulatory, adjuvant and anti-tumor activity of subcutaneously administered CpG-ODN // Cancer Immunol. Immunother. 2007. Vol. 56, No. 8. P. 1251–1264.
23. Kuramoto Y., Kawakami Sh., Zhou Sh. et al. Use of mannoseylated cationic liposomes /immunostimulatory CpG-DNA complex for effective inhibition of peritoneal dissemination in mice // J. of Gene Medicine. 2008. Vol. 10, No. 4. P. 392–399.
24. Li J., Song W., Czerwinski D.K. et al. Lymphoma Immunotherapy with CpG – ODN Requires TLR9 Either in the Host or in the Tumor Itself // J. of Immunology. 2007. Vol. 179. P. 2493–2500.
25. Okamoto M., Sato M. Toll-like receptor signaling in anticancer immunity // J. of Medical Investigation. 2003. Vol. 50. P. 9–24.
26. Sfondrini L., Besusso D., Rumio C. et al. Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in Hor-2- neu transgenic mice by foreign DNA // FASEB. 2002. Vol. 16. P. 1749–1754.
27. Shen W., Waldschmidt M., Zhao X. et al. Antitumor mechanisms of ODN with CpG and poly G motifs in murine prostate cancer cells: decrease of NF- $\kappa$ B and AP-1 binding activities and induction of apoptosis // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2002. Vol. 12, No. 3. P. 155–164.
28. Sun-Je Woo, Chang-Hyun Kim, Mi-Young Park et al. Co-administration of carcinoembryonic antigen and HIVTAT fusion protein with CpG-ODN induces potent antitumor immunity // Cancer Science. 2008. Vol. 99, No. 5. P. 1034–1039.
29. Tetsuya O., Masato O., Tomoyuki T. Antitumor effect of OK-432 – Derived DNA: one of the active constituents of OK-432, a streptococcal immunotherapeutic agent // J. of Immunotherapy. 2006. Vol. 29, No. 2. P. 143–150.
30. Wang H. Rayburn E.R., Wang W. et al. Immunomodulatory oligonucleotides as novel therapy for breast cancer: pharmacokinetics? In vitro and in vivo anticancer activity? And potentiation of antibody therapy // Mol. Cancer Ther. 2006. Vol. 5. P. 2106–2114.
31. Weigel B.J., Rodeberg D.A., Krieg A.M., Blazar B.R. CpG ODN Potentiate the antitumor Effects of Chemotherapy or Tumor Regression in an orthotopic Murine Model of Rhabdomyosarcoma // Clin Cancer Research. 2003. Vol. 9. P. 3105–3114.
32. Whitmore M.M., Li S., Falo K.L., Huang L. Systemic administration of LPD prepared with CpG ODN inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses // Cancer Immunol. Immunother. 2001. Vol. 50, No. 10. P. 503–514.

Поступила в редакцию 03.04.2009.

#### ANTICANCER EFFECT OF EXOGENOUS DEOXYRIBONUCLEIC ACID

N.N. Besednova<sup>1</sup>, L.N. Fedyanina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), <sup>2</sup> Pacific State University of Economics (19 Okeanskiy Av. Vladivostok 690091 Russia)

**Summary** – The authors present an overview of a promising trend in the immunotherapy of malignant neoplasms that consists in application of exogenous DNA enriched in unmethylated CpG motives and natural and synthetic CpG oligodeoxynucleotides. The authors provide results of a combined application of DNA-based drugs, chemotherapy and radiation treatment, and summarize their findings devoted to the study of efficiency of salmon milt-based DNA in preventing and administering complex therapy of oncological diseases.

**Key words:** deoxyribonucleic acid, oligodeoxynucleotides, neoplasms, immune response stimulating agents.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 12–18.