

СрG ДНК природного походження: нові можливості, нові перспективи

¹Олішевський С.В., ¹Козак В.В., ¹Яніш Ю.В., ²Рибалко С.Л., ¹Мазур О.В.,

¹Артамонова А.Б., ¹Шляховенко В.О.

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.

Кавецького НАН України, Київ, Україна

²Київський науково-дослідний інститут епідеміології та інфекційних

захворювань ім. Л.В. Громашевського АМН України, Київ, Україна

sergeyolishovsky@yahoo.com

Вивільнення ДНК з бактерій під час інфекції виступає так званим «danger signal» і призводить до стрімкої та значно вираженої активації імунної системи організму. Виявилось, що за її імуногенні властивості відповідають особливі структурні детермінанти, так звані СрG-мотиви, що зустрічаються у ДНК хребетних з низькою частотою, але досить часто представлені у бактеріальній ДНК. Власне неметильований залишок цитозину та особливості нуклеотидного контексту у так званому СрG-мотиві і визначають імуностимулюючі властивості СрG ДНК. Бактеріальна ДНК є типовим патоген-асоційованим молекулярним патерном, що детектується імунною системою через Toll-like receptor 9 (TLR9). СрG ДНК природного походження та її синтетичні олігонуклеотидні аналоги володіють вираженими імуностимулюючими властивостями, які проявляються в підвищенні проліферативної і кілерної активності лімфоїдних клітин, посиленій секреції ними цитокінів (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-12, TNF- α , хемокіни); підвищеній експресії на поверхні імунокомпетентних клітин молекул МНС I та II, костимулюючих молекул CD80, CD86.

Гетерогенність імуностимулюючих властивостей СрG ДНК виступила підґрунтям для ефективного застосування останньої та її синтетичних аналогів в імунотерапії широкого кола захворювань: інфекційних процесів різної етіології, алергічних хвороб та злоякісних новоутворень. Багато досліджень продемонстрували високу ефективність терапевтичного

застосування CpG ДНК на експериментальних моделях; крім того, зараз чимало синтетичних аналогів CpG ДНК проходять клінічні випробування.

Нами вперше було отримано ДНК, збагачену на неметильовані CG-динуклеотиди, з фільтрату культуральної рідини бактерії *Bacillus subtilis* штаму GP1-807-03 та плодового тіла базидіоміцетового гриба *Pleurotus ostreatus*. Досліджені молекулярний профіль та чутливість отриманих субстанцій до специфічної рестрикційної ендонуклеази HpaII. Виявилось, що ДНК, отримані з обох джерел, демонструють досить високу чутливість до дії HpaII, що свідчить про присутність у їх складі значної кількості неметильованих CG-динуклеотидів. Вивільнення бактеріальної ДНК у культуральне середовище є не просто випадковістю, спричиненою загибеллю культивованих мікробних клітин, а пояснюється можливою присутністю у геномі бактерії дефектних профагових елементів, про що свідчили зрілі фагові частинки ізольовані з культуральної рідини *Bacillus subtilis* GP1-807-03.

У зв'язку з тим, що CpG ДНК є безпосереднім активатором неспецифічних механізмів імунного захисту організму, було досліджено вплив двох ізольованих ДНК-вмісних фракцій на функціональну активність природних кілерних клітин (ПКК) та макрофагів (МФ). Було показано, що бактеріальна і грибна CpG ДНК здатні значно підвищувати цитолітичну активність ПКК (25 та 27% відповідно порівняно з 16% у контролі), стимулювати метаболічну (генерування супероксидних радикалів) та фагоцитарну активність перитонеальних МФ. CpG ДНК з культуральної рідини *Bacillus subtilis* є сильним індуктором ІФН α / γ . Показано, що бактеріальна ДНК в концентрації 1,0 - 2,5 мкг/пробі індукує синтез та секрецію лейкоцитами периферійної крові людини 2560 МО/мл ІФН α та 640 – 1280 МО/мл ІФН γ .

Введення бактеріальної і грибної CpG ДНК тваринам чи інкубація з клітинами імунної системи *in vitro* спричиняє також дозозалежну активацію внутрішньоклітинних ферментів (нуклеаз та протеаз) та змінює поверхневий

електрокінетичний потенціал цих клітин. Показано, що при введенні бактеріальної CpG ДНК тваринам-пухлиноносіям спостерігається або стрімке підвищення поверхневого потенціалу (у випадку перитонеальних МФ, лімфоцитів з периферійних лімфатичних вузлів та мононуклеарних лімфоцитів селезінки), або зниження його до рівня такого у інтактних контрольних тварин (у випадку тимоцитів).

Окрім того, бактеріальна CpG ДНК *in vitro* стимулює бласттрансформацію лімфоїдних клітин і підвищує відповідь мишей на еритроцити барана та інші антигени в реакції гіперчутливості сповільненого типу.

Вже навіть при одноразовому введенні в дозі 20 – 100 мкг/тварину бактеріальна ДНК здатна викликати у лабораторних мишей спленомегалію та лімфаденопатію, що носять транзиторний характер. При інтраперитонеальному введенні вже через добу спостерігається стрімке накопичення клітин перитонеального ексудату (в 5-8 разів більше відносно інтактних тварин) у черевній порожнині мишей.

На культурі клітин Vero (перещеплювані клітини нирки мавпи) показано, що бактеріальна CpG ДНК в концентрації 50 мкг/мл і вище є абсолютно нетоксичною. Токсикологічні дослідження на тваринах тривають.

Також виявлені потенційні противірусні властивості бактеріальної CpG ДНК. Показано, що вона здатна пригнічувати *in vitro* репродукцію таких вірусів, як вірус везикулярного стоматиту та ВІЛ-1. При цьому індекс селективності CpG ДНК бактеріального походження становив 64, а максимально активна концентрація – 0,78 мкг/мл, що дозволяє віднести її до субстанцій з високою противірусною активністю.

Активно досліджуються можливості застосування ДНК бактеріального та грибного походження в імунотерапії злоякісних новоутворень. Високий імуностимулюючий потенціал CpG ДНК природного походження дозволяє застосовувати останню як моно терапевтично, так і у вигляді імунoad`юванта поєднано з протипухлинними аутовакцинами.

На ряді експериментальних моделей пухлинного росту, таких як карцинома Ерїха, саркома 37, лімфоїдна лейкемія L1210, лімфоцитарна лейкемія P388 та ін., показано, що CpG ДНК природного походження виявляє досить сильну протипухлинну активність. Як у профілактичному (до перещеплення пухлини), так і в терапевтичному режимах застосування CpG ДНК здатна досить виразно гальмувати пухлинний ріст та подовжувати термін життя тварин-пухлиноносіїв. Так, при імунотерапевтичному застосуванні ДНК з плодового тіла гриба *Pleurotus ostreatus* на моделі солідної форми карциноми Ерїха показники середньої тривалості життя тварин були вдвічі вищими порівняно з контрольними (77 діб проти 34 у контрольній групі). Введення бактеріальної ДНК тваринам з перещепленою солідною формою саркоми 37 призводило до значного гальмування пухлинного росту (68 та 56% при терапевтичному і профілактичному режимах застосування відповідно). На метастазуючих пухлинних моделях (меланома В16, епідермоїдна карцинома легенів Льюїс) досліджена антиметастатична активність CpG ДНК природного походження.

Показано, що CpG ДНК природного походження може бути ефективним імуоад`ювантом при вакцинотерапії раку. Застосування такої ДНК поєднано з протипухлинною глікопептидною аутовакциною (gp50) в експериментальній імунотерапії пухлин різного гістогенезу в декілька разів підвищує ефективність такої вакцинотерапії. Так, введення бактеріальної CpG ДНК разом з gp50 тваринам з солідною формою саркоми 37 значно підвищувало гальмування пухлинного росту у таких тварин порівняно з просто вакцинованими (60,3 проти 13,4% та 54,2 проти 10,1% при терапевтичній та профілактичній схемі застосування відповідно)

На даний час розпочаті дослідження щодо можливого застосування CpG ДНК при експериментальною хіміотерапією злоякісних пухлин.

Отже, застосування CpG ДНК природного походження представляє собою новий досить ефективний та перспективний імунотерапевтичний підхід до лікування злоякісних новоутворень.