

УДК 612.017.11:577.213/217].08

Н.Н. Беседнова, Т.С. Запорожец

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

ДЕЙСТВИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРОКАРИОТ НА ГУМОРАЛЬНЫЕ И КЛЕТочНЫЕ ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПОЗВОНОЧНЫХ

Ключевые слова: дезоксирибонуклеиновая кислота, олигодезоксинуклеотиды, иммунитет, иммунная система.

Представлены современные сведения о действии ДНК эукариот, естественных и синтетических олигодезоксинуклеотидов, на гуморальные и клеточные факторы врожденного и адаптивного иммунитета. Освещены вопросы о взаимодействии ДНК с толл-подобными рецепторами и инициации врожденного иммунитета. Приведены данные об иммуностимулирующих, адьювантных и антиинфекционных свойствах ДНК прокариот. Показано усиление Т-хелперного 1-го типа иммунного ответа, что открывает перспективы использования ДНК и олигодезоксинуклеотидов при аллергических болезнях, в частности, при бронхиальной астме.

Долгое время существовало мнение, что ДНК про- и эукариот не оказывает заметного влияния на функционирование иммунной системы позвоночных. В дальнейшем это утверждение было пересмотрено и ДНК прокариот стали считать одной из наиболее иммуногенных молекул природного происхождения, «золотым стандартом» адьювантов [24].

В 1984 г. японские ученые получили из *Mycobacterium bovis* BCG препарат Му-1, содержащий 70% ДНК и 28% РНК, который активировал НК-клетки и вызывал регрессию некоторых экспериментальных опухолей [29]. Доказательством того, что именно ДНК является действующим началом экстракта, была потеря последним иммуногенных свойств после обработки нуклеолитическими ферментами. Позже было установлено, что бактериальная ДНК повышает литическую активность мононуклеаров периферической крови человека [19].

Имуностимулирующую активность бактериальной ДНК определяет присутствие в ее составе метилированных динуклеотидов – CpG-мотивов. Высокополимерную ДНК или ее короткие последовательности, содержащие метилированные CpG-мотивы, оказывающие выраженный стимулирующий эффект на иммунную систему позвоночных, называют иммуностимулирующими CpG-ДНК [4]. ДНК можно получать из различных грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также из ДНК-вирусов.

У 2% многоклеточных организмов иммунная система представлена двумя взаимосвязанными элементами – врожденным и адаптивным иммунитетом [7]. Одной из функций врожденного иммунитета является распознавание и элиминация в первые часы после заражения вторгшегося в организм патогена и выработка сигналов, обуславливающих формирование специфического иммунного ответа. Быстрая защита

от любого патогена (в течение нескольких часов от момента инвазии) может быть создана путем стимуляции системы врожденного иммунитета.

Индикация бактериальной ДНК иммунной системой позвоночных происходит путем взаимодействия этого биополимера с толл-подобными рецепторами (Toll-Like Receptor – TLR), которые являются наиболее древними представителями обширных семейств рецепторов, определяющих консервативные молекулярные структуры – паттерны возбудителей [17]. TLR в настоящее время считаются ключевым элементом распознавания «чужого» системой клеток хозяина. В качестве «чужого» рассматриваются, как правило, патогенные и условно-патогенные микроорганизмы (бактерии, вирусы). Паттерны, распознаваемые TLR, описаны у многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, ряда оболочечных вирусов, некоторых грибов и отдельных простейших.

TLR состоят из двух доменов. Внеклеточный домен содержит варьирующее число лектиновых повторов. Предполагают, что эти повторы обеспечивают прямое взаимодействие с лигандами микроорганизмов или их нуклеиновыми кислотами. Цитоплазматический участок TLR сходен с цитоплазматическим доменом рецептора интерлейкина-1. Через него начинается трансляция сигналов, активированных TLR. Передачу сигналов внутри клетки, несущей TLR, представляют как последовательную активацию цитоплазматических адаптерных молекул (MyD88 и др.), киназ (MAPK) и ядерного фактора транскрипции (NFκB) [7].

TLR экспрессированы главным образом на клетках системы врожденного иммунитета – макрофагах, дендритных клетках, нейтрофилах, моноцитах, Т- и В-лимфоцитах, эпителиальных клетках, клетках кишечника, кератиноцитах кожи, клетках микроглии. Бактериальную ДНК распознает TLR9, находящийся во внутриклеточных органеллах – цитоплазматических эндоцитозных везикулах [21]. Есть данные, что этот биополимер распознают еще TLR2 и TLR4.

При контакте ДНК или олигодезоксинуклеотидов (ОДН) с TLR стремительно активируются различные факторы врожденного иммунитета – первой линии защиты организма от инфекционных возбудителей, паразитов и трансформированных клеток [1, 24]. Активация внутреннего домена рецептора приводит к выраженному и быстрому образованию реактивных форм кислорода и активации нитроксидсинтазы. Все это позволяет считать ДНК агонистом TLR9.

Благодаря высокому содержанию в ДНК прокариот неметирированных фрагментов CpG она воспринимается организмом позвоночных как патогенный чужеродный агент, способный вызвать инфекционный процесс.

CpG-ДНК непосредственно или как костимулирующий сигнал активирует фактически все клетки иммунной системы [10]. Нуклеотиды стимулируют иммунокомпетентные клетки, способствуя их пролиферации, дифференцировке, хемотаксису, секреции цитокинов, высвобождению лизосомальных компонентов и образованию молекул реактивного кислорода или нитроксидсинтазы [6].

CpG-ДНК оказывает прямое активирующее действие на антигенпрезентирующие клетки (макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты). Этот биополимер является мощным активирующим сигналом для дендритных клеток животных и человека, вызывает продукцию ими цитокинов, ассоциированных с Т-хелперами 1-го типа (интерлейкины 12 и 18), достигающую высокого уровня. Кроме того, CpG-ДНК ускоряет созревание дендритных клеток, определяемое экспрессией CD83, экспрессию костимуляторных молекул ICAM-1, а также CD40 и молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, что увеличивает способность активировать Т-лимфоциты [19].

CpG-ДНК превосходит гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF) в действии на выживаемость первичных дендритных клеток, полученных из крови, и индуцирует дифференцировку клеток, которая находит отражение в увеличении их размеров, числа гранул, а также экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса. Комбинация CpG-ДНК и GM-CSF еще больше усиливает активацию и созревание дендритных клеток, что свидетельствует о различных путях действия этих факторов. Известно, что CpG-ДНК препятствует спонтанному апоптозу дендритных клеток [26].

Макрофаги играют ведущую роль в клиренсе ДНК. Отмечают значительные различия в последствиях стимуляции этим биополимером макрофагов и дендритных клеток. Так, по данным R.S. Chu et al. [12] только для дендритных клеток характерна активация процессинга и презентации антигена, т.к. CpG-ДНК уменьшает экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости II класса на макрофагах, что приводит к угнетению процессинга и презентации антигена этими клетками. При воздействии CpG-ДНК в макрофагах увеличиваются уровни внутриклеточных реактивных радикалов кислорода. Однако есть сведения, что ДНК оказывает стимулирующее действие как на дендритные клетки, так и на макрофаги [28].

Под действием CpG-ДНК *in vitro* активируются клетки глии, которые начинают продуцировать фактор некроза опухоли- α , интерлейкины 12p40 и 12p70,

а также оксид азота. Усиливается фагоцитарная активность. После интрацеребровентрикулярной инъекции CpG-ДНК микроглиальные клетки активируются и продуцируют фактор некроза опухоли- α и интерлейкин-12p40. Это свидетельствует о чувствительности клеток микроглии к CpG-ДНК, в связи с чем она может играть значительную роль в течении инфекционных болезней центральной нервной системы и быть причиной иммунопатологических реакций [13].

CpG-ДНК активирует В-лимфоциты, усиливает экспрессию мембранного иммуноглобулина М и стимулирует секрецию интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α . CpG-ДНК напрямую активирует дендритные клетки и В-лимфоциты, экспрессирующие TLR9, который связывает биополимер и тем самым обуславливает его стимулирующий эффект. Кроме того, CpG-ДНК стимулирует факторы врожденного иммунитета напрямую и опосредованно (через Т-лимфоциты, NK-клетки и нейтрофилы), в результате чего изменяется экспрессия рецепторов специфических цитокинов, костимуляторных молекул и молекул адгезии [11].

Эффект CpG-ОДН зависит от возраста животных. Так, у жеребят ОДН не индуцируют специфического созревания и экспрессии цитокинов макрофагами и дендритными клетками. Кроме того, у молодых животных снижена экспрессия рецепторов молекул главного комплекса гистосовместимости II класса как на макрофагах, так и на дендритных клетках. У взрослых лошадей под действием CpG-ОДН наблюдается выраженная продукция интерлейкина-12 и γ -интерферона [15].

CpG-мотивы бактериальной ДНК могут пролонгировать и усиливать воспаление путем подавления апоптоза нейтрофильных гранулоцитов [20].

Влияние ДНК на Т-лимфоциты может реализоваться как опосредованно через активированные антигенпрезентирующие клетки и секретируемые ими цитокины, так и путем непосредственного влияния на эти клетки. Под действием ДНК происходит пролиферация Т-клеток, секреция ими интерлейкина-2 и экспрессия интерлейкин-2-рецептора.

В настоящее время в клинической практике и научных исследованиях часто используют синтетические CpG-мотивы. Существуют различные классификации этих веществ. По одной из них CpG-мотивы разделяют на типы А, В, С, D, К [23]. Мотивы А и D стимулируют продукцию α -интерферона, активируют NK-клетки, подавляют рост опухолей. Мотивы типов В и К стимулируют антигенпрезентирующие клетки, активируют и вызывают пролиферацию В-лимфоцитов. Мотивы типа С способны вызывать синтез интерферона 1-го типа (α/β -интерферона) и значительную стимуляцию В-лимфоцитов.

Синтетические олигонуклеотидные аналоги отличаются не только нуклеотидной последовательностью, но и активностью, а также спецификой опосредуемых иммуностимулирующих эффектов [32]. Они

проявляют такую же активность, как и природные. Как показали исследования В.Г. Пак и др. [5], синтетические CpG-ОДН повышали бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата, но не влияли на их поглотительную активность. В качестве перспективной для дальнейшего получения лекарственной формы авторы предложили один из олигодезоксинуклеотидов (ОДН 2395), который значительно стимулирует продукцию цитокинов, ассоциированных с Т-хелперами 1-го типа (интерлейкина-12 и γ -интерферона), увеличивает бактерицидность клеток перитонеального экссудата и NK-литическую активность.

Синтетические ОДН, содержащие неметилованные CpG-мотивы, напрямую стимулируют В-клетки и плазматоидные дендритные клетки, продукцию Т-хелперов 1-го типа и провоспалительных цитокинов и ускоряют созревание/активацию профессиональных антигенпредставляющих клеток. Активность CpG-ОДН зависит от их первичной структуры [14]. ОДН, содержащие TTAGGG-мотивы, проявляют иммуносупрессивную активность и подавляют продукцию провоспалительных цитокинов [23]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что «супрессивные» ОДН могут быть использованы для подавления иммунопатологических реакций.

Одним из наиболее интересных и практически значимых свойств ДНК является ее способность значительно повышать уровень иммунного ответа даже на очень низкоиммуногенные антигены [16]. ДНК по этому показателю превосходит адъювант Фрейнда. CpG-ДНК защищает В-лимфоциты от спонтанного апоптоза, действия антиопухолевой химиотерапии, а также ультрафиолетовой радиации [33]. Адъювантную активность CpG-ДНК объясняют ее способностью опосредованно через дендритные или другие антигенпрезентирующие клетки активировать секрецию цитокинов Т-хелперами 1-го типа. Кроме того, основным преимуществом CpG-ДНК является то, что в отличие от полного адъюванта Фрейнда это вещество не обладает выраженной токсичностью [18].

Дезоксинуклеотиды также обладают адъювантными свойствами. Синтетические ОДН в настоящее время рассматриваются в качестве потенциальных адъювантов для опухолевых антигенов. Показана эффективность синтетических ОДН при вакцинации против гриппа и гепатита В. При этом наблюдался Т-хелперный 1-го типа ответ при гриппозной вакцинации и Т-хелперные 1-го и 2-го типов ответы – при вакцинации против гепатита В [9].

Другие авторы в экспериментах показали, что иммунизация мышей против гепатита В с использованием CpG-ДНК и CpG-ОДН приводила к повышению титра антител к антигену вируса, причем уровень антител в этом случае был в 6 раз выше, чем при использовании стандартного адъюванта – гидроокиси алюминия [23]. В случае же одновременного использования этих двух адъювантов титры антител к антигену вирусного гепатита В были в 35 раз выше, чем при ис-

пользовании только гидроокиси алюминия. Кроме того, стандартный адъювант индуцировал Т-хелперный 2-го типа гуморальный ответ (иммуноглобулин G1), а CpG-ОДН – Т-хелперный 1-го типа ответ с преимущественной продукцией иммуноглобулина G2.

Хорошие результаты дает комбинация CpG-ОДН с сибиреязвенной вакциной (AVA – лицензированная вакцина для иммунизации людей): увеличивается скорость образования антител, их титр и avidность. Не менее эффективно применение в качестве адъюванта CpG-ОДН в комплексе с нетоксичной субъединицей В холерного токсина. Такой конъюгат стимулирует более высокие титры провоспалительных цитокинов и хемокинов клетками мышинной селезенки. Иммуномодулирующий эффект комплекса осуществляется через TLR9-MуD88- и NF κ B-зависимый пути. При использовании столбнячного токсина в качестве вакцинного антигена его комплекс с CpG-ОДН значительно повышает уровень специфических иммуноглобулинов [8].

D. Verthelyi et al. [31] в экспериментах на макаках-резус установили эффективность CpG-ОДН (К и Д типов) у ВИЧ-инфицированных животных. Как известно, ВИЧ-инфицированным пациентам рекомендуется вакцинация против гепатита В. Однако у части из них эффективность подобных прививок невысока. В связи с этим авторы рекомендуют использовать их результаты и провести клиническое изучение эффективности CpG-ОДН в качестве адъюванта при вакцинации таких лиц.

С целью повышения эффективности ОДН используют катионные липидные комплексы, липосомы, при применении которых увеличиваются показатели иммунного ответа (в частности, уровень цитокинов) и наблюдается выраженный терапевтический эффект [30]. Вклад липосом в иммунный ответ определяется их способностью связывать значительное число молекул CpG-ОДН путем электростатического взаимодействия, что обеспечивает индукцию высокого уровня интерлейкина-12, необходимого для дифференцировки Т-хелперов 1-го типа. Такие комплексы могут быть основой для создания в будущем эффективных вакцин.

Механизмы антиинфекционного действия микробной ДНК связаны в значительной степени с активацией врожденного иммунитета, а также с тем, что она направляет иммунный ответ по Т-хелперному 1-го типа пути, который обеспечивает защиту от внутриклеточных патогенов. Даже однократное введение животным бактериальной CpG-ДНК создает долгосрочную (в течение 2–4 недель) защиту против смертельной дозы факультативных внутриклеточных паразитов *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Plasmodium malariae* и др. [2]. Есть данные о том, что CpG-ДНК обладают иммунопротективной активностью и по отношению к внеклеточным микроорганизмам (*Escherichia coli*). Антиинфекционное действие ДНК достаточно полно представлено в обзоре А.М. Krieg [24].

Бактериальная ДНК оказывает влияние на морфологию органов иммунной системы [3]. Подкожное введение этого биополимера индуцирует локальную транзиторную гиперплазию лимфатических узлов, умеренное повышение спленического индекса и клеточности селезенки. Введение CpG-ДНК в брюшную полость вызывает резко выраженное увеличение массы и клеточности этого органа. Ответ тимуса на введение бактериальной ДНК носит двухфазный характер: начальная фаза — ответ на антиген как на стимул, и поздняя фаза — пролиферация.

Являясь мощным адъювантом и стимулятором активности Т-хелперов 1-го типа, CpG-ДНК предотвращает повышение чувствительности к аллергенам даже у предварительно сенсибилизированных животных [22]. Способность этих биополимеров избирательно стимулировать Т-хелперный 1-го типа ответ может быть использована для лечения заболеваний, обусловленных преобладанием активности Т-хелперов 2-го типа, в частности, аллергических болезней (например, бронхиальной астмы). Развитие Т-хелперного 1-го типа иммунного ответа происходит путем воздействия CpG-ДНК на TLR. CpG-ОДН снижают уровень эозинофилии, уменьшают миграцию Т-хелперов 2-го типа в легкие, образование слизи в дыхательных путях, а также продукцию интерлейкина-2. Все это резко обрывает воспалительный процесс [27].

Перспективными являются исследования, касающиеся использования иммуностимулирующей CpG-ДНК в стареющем организме. На основании доказательных экспериментов здесь рекомендовано учитывать действие этого биополимера при разработке стратегии иммунизации пожилых людей [25].

Таким образом, под действием бактериальной ДНК имеют место два этапа активации иммунного ответа: антигеннезависимый, состоящий в активации факторов врожденного иммунитета, и антигензависимый, на котором происходит развитие специфического иммунного ответа. На первом этапе ДНК стимулирует факторы врожденного иммунитета, в результате чего происходит секреция γ -интерферона и цитокинов, необходимых для ее индукции (α - и β -интерферон, интерлейкины 12 и 18), которые определяют превращение недифференцированных Т-хелперов в Т-хелперы 1-го типа. На втором этапе под действием цитокинов первого этапа Т- и В-лимфоциты активируются при контакте с антигеном, в результате чего индуцируется секреция γ -интерферона и антител, специфических к антигену. Уровень интерферона на втором этапе активации гораздо выше, чем на первом.

Совокупность изложенных материалов позволяет заключить, что ДНК эукариот, а также ОДН (естественные и синтетические) могут быстро создать неспецифическую защиту против различных патогенов (бактерий, вирусов, простейших). Эти биополимеры распознаются рецепторами системы врожденного

иммунитета, взаимодействие с которыми в течение нескольких часов активирует эффекторную систему и запускает процессы, ведущие к элиминации патогена и формированию протективного (адаптивного) иммунитета против конкретного патогена. Немаловажное значение имеют адъювантные свойства ДНК, что может быть использовано при вакцинации организма слабоиммуногенными вакцинами или в тех случаях, когда у человека или животных недостаточно вырабатываются защитные антитела. ДНК прокариот, а также ОДН могут войти в набор бактериальных антигенов, несущих панель патогенассоциированных молекулярных структур, которые являются лигандами для достаточно хорошо охарактеризованных девяти TLR. Такая комбинация антигенов будет создавать быструю защиту не только от бактерий, но и от вирусов [2].

Литература

1. Байракова А.Л., Воропаева Е.А., Афанасьев С.С. и др. Роль и биологическое значение толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма // *Вестник РАМН*. 2008. № 1. С. 45–54.
2. Биологическая безопасность // Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В. и др. Москва: Медицина, 2006. 304 с.
3. Олишевский С.В., Шляховенко М.А., Козак В.В., Яниш Ю.В. Реакция различных органов иммунной системы на введение бактериальной CpG-ДНК // *Экспериментальная онкология*. 2005. Т. 27, № 4. С. 50–55.
4. Олишевский С.В., Козак В.В., Яниш Ю.В. и др. Иммуностимулирующая CpG-ДНК: перспективы клинического применения в онкологии // *Онкология*. 2006. Т. 8, № 2. С. 209–217.
5. Пак В.Г., Олиферук Н.С., Будихина А.С., Пинегин Б.В. Влияние естественных и синтетических CpG-мотивов на бактерицидность, НК-литическую активность, индукции. ИЛ-12 и ИФН γ in vitro // *Иммунология*. 2005. № 6. С. 332–335.
6. Серебряная Н.Б., Калинина Н.М. Иммуномодулирующая активность и эффективность использования в терапии воспалительных заболеваний препаратов нативной ДНК — дернатина и ферровира // *Иммунитет и болезни: от теории к терапии: мат. междунар. конгресса*. М., 2005. С. 58–59.
7. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А. Сидорович И.Г. *Иммунология*. М.: Медицина, 2002. 536 с.
8. Adamson J., Lindblad M., Lundqvist A. et al. Novel immunostimulatory agent based on CpG ODN linked to the nontoxic B subunit of cholera toxin // *J. Immunol*. 2006. V. 176, No. 8. P. 4902–4913.
9. Avia J., Igal L., Plis-Finarov A. et al. Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parental and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines // *Vaccine*. 2002. Vol. 20, No. 27–28. P. 3342–3354.
10. Ballas Z.K. Modulation of NK cell activity by CpG oligodeoxynucleotides // *Immunologic Research*. 2007. Vol. 39, No. 1–3. P. 15–21.
11. Bendigs S., Salzer U., Lipford G.B. et al. CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells // *Europ. J. Immunology*. 1999. Vol. 29, No. 4. P. 1209–1218.
12. Chu R.S., Askew D., Noss E.N. et al. CpG oligodeoxynucleotides downregulate macrophage class II MHC antigen processing // *J. Immunology*. 1999. Vol. 163. P. 1188–1194.
13. Dalpke A.H., Schafer M.K.-H., Frey M. et al. Immunostimulatory CpG-DNA Activates Murine Microglia // *The J. of Immunology*. 2002. Vol. 168. P. 4854–4863.
14. Du H., Xia Sh., Song H. et al. Structure efficacy relationships of immunostimulatory activity of CpG-containing oligodeoxynucleotides on mouse spleen cells // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2007. Vol. 20, No. 10. P. 1637–1644.