treatment is actual despite the presence of wide range of medicinal preparations. The derivative of tiokhinazolin NC-224, which is perspective from the view point of search of preparations with neuroprotective properties, is investigated in present work.

Key words: stroke, «oxidation stress», neuroprotector.

УДК 616.006.04:615.37:579.852.11:577.113:57.083.3

С. В. Олишевский, В. В. Козак, Ю. В. Яниш,
В. А. Шляховенко

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА CpG ДНК ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *BACILLUS SUBTILIS*

Бактериальная ДНК, в отличие от ДНК позвоночных, содержит относительно большое количество неметилированных CG-динуклеотидов, отвечающих за ее выраженные иммуностимулирующие свойства [1; 2]. Известно, что ДНК, обогащенная неметилированными CpG-последовательностями, является более мощным Тх1-адъювантом даже по сравнению с полным адъювантом Фрейнда [2 – 4]. Сегодня иммунотерапевтическое применение CpG ДНК рассматривается как перспективная стратегия для лечения и предупреждения различных инфекционных болезней, аллергии и злокачественных новообразований [5 – 8].

В предыдущих исследованиях было показано, что введение мышам бактериальной CpG ДНК (бCpG ДНК), выделенной из культуральной жидкости *Bacillus subtilis,* приводит к транзиторному развитию у них спленомегалии, гиперплазии лимфатических узлов и асептического перитонита [9]. В условиях *in vitro* выявлено, что такая ДНК повышает цитотоксическую активность естественных киллерных клеток и является мощным индуктором интерферонов [10].

Целью данной работы было исследование влияния бCpG ДНК из культуральной жидкости *B. subtilis* на развитие клеточного и гуморального иммунного ответа у мышей, а также изучение возможности ее применения в экспериментальной биотерапии злокачественных новообразований.

В эксперименте использовали 3-месячных мышей линий CBA и BALB/c разводки вивария ИЭПОР им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины. Все исследования проведены при соблюдении правил этического обращения с лабораторными животными. Бактериальная CpG ДНК была выделена из культуральной жидкости *B. subtilis* GP1-807-03 согласно

[11]. В качестве модели опухолевого роста использовали карциному Эрлиха (КЭ), полученную из Национального банка клеточных линий и опухолевых штаммов ИЭПОР им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины.

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) на эритроциты барана (ЭБ) изучали по общепринятой методике [12]. При этом бCpG ДНК вводили мышам CBA интраперитонеально в дозах 0,25; 1,0 или 2,5 мг/кг массы тела за 24 часа перед или одновременно с иммунизацией ЭБ. Контрольные мыши получали аналогичные инъекции фосфатного буферного раствора. Развитие РГЗТ оценивали по разнице массы нижних лапок, а также регионарного и контрлатерального подколенных лимфатических узлов через 24 часа после введения разрешающей дозы ЭБ [13]. Индекс реакции (ИР) определяли по формуле:

$$ИР = (Po – Pк) / Pк \times 100\ \%,$$

где Po и Pк – реакция в опытной лапке (регионарном лимфатическом узле) и контрольной лапке (контрлатеральном лимфатическом узле) соответственно.

Цитотоксическую активность (ЦТА) сыворотки крови изучали у мышей BALB/c, которым трижды с 3-дневным интервалом вводили бCpG ДНК в дозах 0,25 или 1,0 мг/кг массы тела, начиная сразу после подкожной трансплантации 2,5 $\times 10^5$ клеток КЭ. ЦТА сыворотки крови оценивали согласно [14] на 2, 5 и 12-е сутки после трансплантации КЭ и выражали в виде цитотоксического индекса (ЦИ), определенного по формуле:

$$ЦИ = (a – b / a) \times 100\%,$$

где a и b – количество жизнеспособных опухолевых клеток в контроле и опыте соответственно.

Для оценки противоопухолевой эффективности применения бCpG ДНК мышам BALB/c интраперитонеально трансплантировали 2,0 $\times 10^5$ клеток КЭ. Через 24 часа начинали вводить бCpG ДНК (терапевтический режим) в дозе 0,5 мг/кг трижды с 3-дневным интервалом подкожно в подушечку задней лапки мышей. В случае профилактического применения бCpG ДНК вводили аналогично и через 7 суток после окончательного введения исследуемой субстанции животным трансплантировали КЭ. Эффективность биотерапии оценивали по динамике выживаемости с использованием показателей средней продолжительности жизни (СПЖ) и увеличения СПЖ – УПЖ (%) мышей-опухоленосителей.

Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента и программы GraphPad InStat.

В ходе исследования установлено, что введение бCpG ДНК мышам повышает уровень клеточного иммунного ответа на ЭБ (рис. 1). При одновременном введении 0,25 или 1,0 мг/кг массы тела бCpG ДНК и ЭБ наблюдали статистически недостоверное повышение уровня РГЗТ,

тогда как применение большей дозы бCpG ДНК (2,5 мг/кг массы тела) приводило к выраженному и статистически достоверному ($p < 0,01$) повышению иммунного ответа на ЭБ. При введении животным аналогичных доз бCpG ДНК за 24 часа до сенсибилизации ЭБ во всех случаях наблюдали выраженное повышение ИР после осуществления разрешающей инъекции ЭБ. Наиболее выраженный адъювантный эффект (значения ИР – 89,8 ± 15,0 и 98,5 ± 28,0) был отмечен у мышей, которым вводили наибольшую дозу бCpG ДНК (2,5 мг/кг массы тела) (рис. 1).

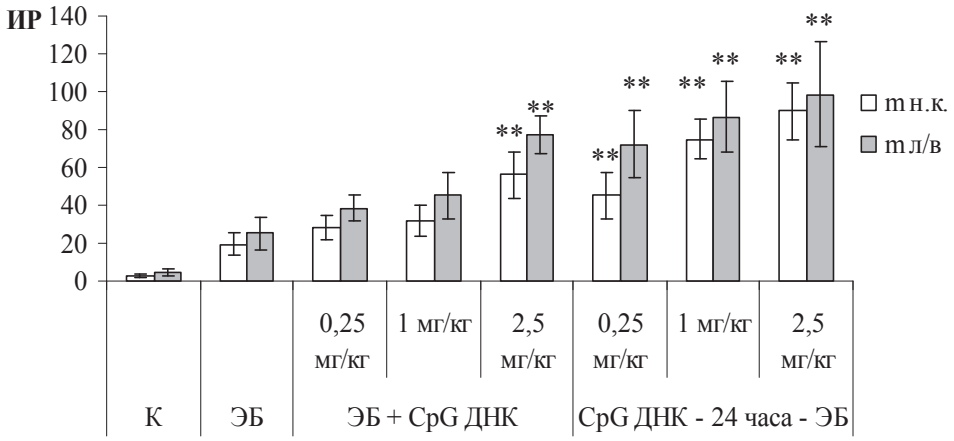

Рис. 1. Модулирующее влияние бCpG ДНК на развитие РГЗТ у мышей линии CBA (n = 7)

Примечание: К – контроль; m н.к. – ИР, вычисленный по разнице массы нижних конечностей; m л/в – ИР, вычисленный по разнице массы подколенных лимфатических узлов; ** – $p < 0,01$ в сравнении с группой мышей, которым вводили только ЭБ.

Исследование ЦТА сыворотки крови у мышей с солидной КЭ показало, что введение бCpG ДНК приводит к повышению данного показателя, которое зависит от количества введений исследуемой субстанции и длительности роста КЭ (табл. 1).

Заметные изменения показателей ЦТА сыворотки крови у животных-опухоленосителей, которым вводили бCpG ДНК, наблюдались уже после первого введения – на 2-е сутки после перевивки КЭ и составили около 11,5 – 15,0 % по сравнению с 5,8 % у контрольных животных.

Данные, приведенные в табл. 1, демонстрируют существенное повышение ЦТА сыворотки крови у мышей с КЭ после двух последующих введений бCpG ДНК. При введении бCpG ДНК в дозе 1,0 мг/кг наблюдалось более выраженное и стойкое повышение ЦТА сыворотки крови (ЦИ равнялся 54,2 и 68,3 % на 5-е и 12-е сутки опухолевого роста по сравнению с соответствующими контрольными

значениями – 17,2 и 14,5 %). Применение бCpG ДНК в меньшей дозе (0,25 мг/кг) также приводило к существенному повышению исследуемого показателя (до 48,4 %) после 2-го введения (на 5-е сутки после трансплантации опухоли), однако на 12-е сутки опухолевого роста (осуществлены три введения) наблюдалось снижение данного показателя до 36,5 %.

Таблица 1

Влияние бCpG ДНК на ЦТА сыворотки крови мышей (n = 5) с солидной формой КЭ

Доза бCpG ДНК, мг/кг массы тела	Количество введений/сутки после трансплантации КЭ	ЦИ, %
0,25	1/2-е 2/5-е 3/12-е	11,5±3,7* 48,4±8,5** 36,5±6,0**
1,0	1/2-е 2/5-е 3/12-е	15,0±4,5* 54,2±8,0** 68,3±5,5**/***
Контроль	0/2-е 0/5-е 0/12-е	5,8±1,1 17,2±2,5 14,5±3,0

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ в сравнении с соответствующим значением контроля; *** – $p < 0,001$ в сравнении с соответствующим значением ЦИ при введении 0,25 мг/кг бCpG ДНК.

Как свидетельствуют результаты проведенных экспериментов, эффективность биотерапевтического применения бCpG ДНК на модели асцитной формы КЭ зависела от режима введения препарата: профилактический режим оказался более эффективным, чем терапевтический режим введения, о чем свидетельствуют показатели продолжительности жизни мышей-опухоленосителей (табл. 2). Динамика выживаемости животных-опухоленосителей, представленная на рис. 2, также наглядно свидетельствует об отсроченной гибели мышей, которым вводили бCpG ДНК.

Таблица 2

Эффективность биотерапевтического применения бCpG ДНК на модели асцитной формы КЭ

Группа животных	Режим применения	СПЖ, сутки	УПЖ, %
бCpG ДНК (n = 10)	Терапевтический Профилактический	18,0 ± 6,5 24,0 ± 5,2**/*	30,3 74,0
Контроль (n = 10)		13,8 ± 4,1	–

Примечание: ** – $p < 0,001$ в сравнении с контролем; * – $p < 0,05$ в сравнении с терапевтическим режимом введения бCpG ДНК.

Следует отметить, что полученные в данном исследовании эффекты бCpG ДНК совпадают с наблюдениями других исследователей [2 – 4; 15] и подтверждают предполагаемую перспективность применения природных и синтетических субстанций такого плана для создания новых эффективных биотерапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований.

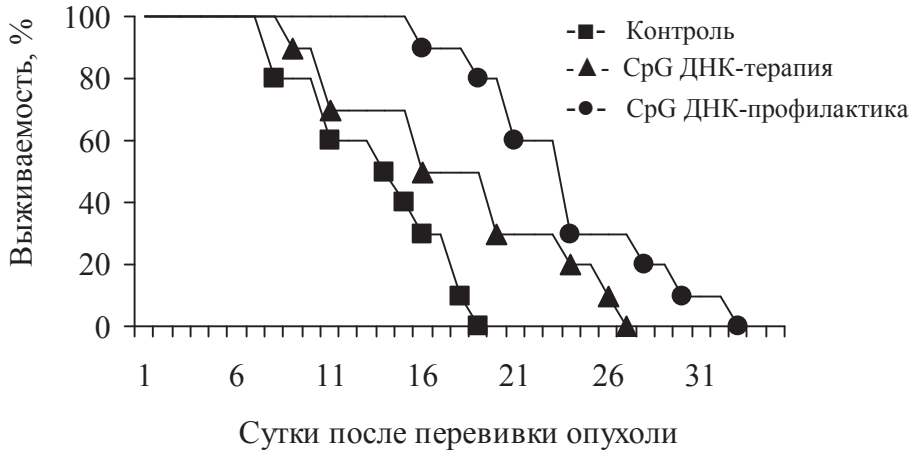

Рис. 2. Динамика выживаемости мышей BALB/c с трансплантированной асцитной формой КЭ на фоне применения бCpG ДНК в терапевтическом и профилактическом режимах введения

Итак, в результате проведенных исследований установлено следующее:

1. Бактериальная CpG ДНК, полученная из культуральной жидкости *B. subtilis*, обладает адъювантными свойствами, которые проявляются в усилении клеточного иммунного ответа на эритроциты барана в реакции гиперчувствительности замедленного типа.

2. Введение бCpG ДНК животным с карциномой Эрлиха приводит к повышению цитотоксической активности сыворотки крови, что свидетельствует об усилении развития в организме животных противоопухолевого иммунного ответа гуморального типа.

3. Применение бCpG ДНК в профилактическом режиме является более эффективным, чем в терапевтическом режиме, что подтверждается показателями продолжительности жизни мышей с трансплантированной асцитной формой карциномы Эрлиха.

Литература

1. Häcker G. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA / G. Häcker, V. Redecke, H. Häcker // Immunol. – 2002. – Vol. 105, No. 3. – P. 45 – 51. **2. Krieg A. M.** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects / A. M. Krieg // Annu. Rev. Immunol. – 2002. – Vol. 20. – P. 709 – 760. **3. Carson D. A.** Oligonucleotide adjuvants for T helper 1 (Th1)-specific vaccination / D. A. Carson, E. Raz // J. Exp. Med. – 1997. – Vol. 186, No. 10. – P. 1621 – 1622. **4. CpG oligodeoxynucleotides** act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity / R. S. Chu, O. S. Targoni, A. M. Krieg et al. // J. Exp. Med. – 1997. – Vol. 186, No. 10. – P. 1623 – 1631. **5. Иммуностимулирующая** CpG ДНК: перспективы клинического применения в онкологии / С. В. Олишевский, В. В. Козак, Ю. В. Яниш и др. // Онкология. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 209 – 217. **6. Klinman D. M.** Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides / D. M. Klinman // Nature Rev. Immunol. – 2004. – Vol. 4, No. 4. – P. 1 – 10. **7. Immunostimmulatory** CpG DNA in cancer vaccinotherapy / S. V. Olishevsky, V. V. Kozak, Y. V. Yanish, V. A. Shlyakhovenko // Exp. Oncol. – 2003. – Vol. 25, No. 2. – P. 83 – 92. **8. Van Uden J.** Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease / J. Van Uden, E. Raz // J. Allergy Clin. Immunol. – 1999. – Vol. 104, No. 5. – P. 902 – 910. **9. Response** of different organs of immune system of mice upon administration bacterial CpG DNA / S. Olishevsky, V. Shlyakhovenko, V. Kozak, Yu. Yanish // Exp. Oncol. – 2005. – Vol. 27, No. 4. – P. 290 – 297. **10. Anticancer** and immunostimulatory effects of nucleoprotein fraction of *Bacillus subtilis* 7025 culture medium filtrate / V. A. Shlyakhovenko, S. V. Olishevsky, V. V. Kozak et al. // Exp. Oncol. – 2003. – Vol. 25, No. 2. – P. 119 – 123. **11. Characteristics** of extracellular DNA containing unmethylated CpG motifs isolated from *Bacillus subtilis* culture medium filtrate / S. Olishevsky, V. Kozak, Yu. Yanish et al. // Exp. Oncol. – 2004. – Vol. 26, No. 4. – P. 265 – 270. **12. Исследование** иммуностимулирующей активности комплекса веществ мурамилпептидной природы в опытах *in vivo* и *in vitro* / А. И. Ильинская, Л. В. Пичугина, В. В. Кулаков и др. // Иммунология. – 2004. – Т. 25, № 5. – С. 271 – 274. **13. Лазарева Г. А.** Иммуномодулирующие эффекты, вызываемые регуляторами энергетического обмена, тепловыми и холодовыми воздействиями при токсическом поражении почек / Г. А. Лазарева, И. Л. Бровкина // Патол. физиол. эксперим. мед. – 2005. – № 3. – С. 4 – 6. **14. Брондз Б. Д.** Изучение цитотоксического эффекта клеточных и гуморальных изоантител. 1. Цитотоксическое действие гуморальных изоантител на клетки «резистентной» саркомы мышей / Б. Д. Брондз // Вопр. онкол. – 1964. – Т. 190, № 3. – С. 9 – 16. **15. Immunostimulatory** oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization / G. J. Weiner, H. -M. Liu,

J. E. Wooldridge et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94, No. 20. – P. 10833 – 10837.

Олишевский С. В., Козак В. В., Яниш Ю. В., Шляховенко В. А. Иммуностимулирующие и противоопухолевые свойства CpG ДНК из культуральной жидкости *Bacillus subtilis*

Исследовали иммуностимулирующую активность бактериальной CpG ДНК из культуральной жидкости *Bacillus subtilis*, а также возможность ее применения в экспериментальной биотерапии опухолей. Введение бактериальной CpG ДНК мышам усиливает развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана, а также повышает цитотоксическую активность сыворотки крови у мышей с солидной карциномой Эрлиха. Иммунизация бактериальной CpG ДНК мышей с асцитной карциномой Эрлиха увеличивает их выживаемость, особенно в случае профилактического введения исследуемой субстанции.

Ключевые слова: бактериальная CpG ДНК, гиперчувствительность замедленного типа, противоопухолевый эффект, цитотоксическая активность сыворотки крови.

Олішевський С. В., Козак В. В., Яніш Ю. В., Шляховенко В. О. Імуностимулювальні та протипухлинні властивості CpG ДНК з культуральної рідини *Bacillus subtilis*

Досліджували імуностимулювальну активність бактеріальної CpG ДНК з культуральної рідини *Bacillus subtilis*, а також можливість її застосування в експериментальній біотерапії пухлин. Введення бактеріальної CpG ДНК мишам посилює розвиток реакції гіперчутливості уповільненого типу до еритроцитів барана, а також підвищує цитолітичну активність сироватки крові у мишей з солідною карциномою Ерліха. Імунізація бактеріальною CpG ДНК мишей з асцитною карциномою Ерліха збільшує їх виживаність, особливо у випадку профілактичного введення досліджуваної субстанції.

Ключові слова: бактеріальна CpG ДНК, гіперчутливість уповільненого типу, протипухлинний ефект, цитотоксична активність сироватки крові.

Olishevsky S. V., Kozak V. V., Yanish Yu. V., Shlyakhovenko V. O. Immunostimulatory and anticancer effects of CpG DNA isolated from culture medium of *Bacillus subtilis*

Immunostimulatory activity and biotherapeutical potential of bacterial CpG DNA (bCpG DNA) from *Bacillus subtilis* culture medium have been investigated in experiments. The augmentation of the delayed type hypersensitivity to sheep erythrocytes in normal mice and the increase of blood serum cytotoxic activity in mice with solid Ehrlich carcinoma after

administration of bCpG DNA were revealed. The present findings suggest that injections of bCpG DNA to mice with ascitic Ehrlich carcinoma increase the survival rates of tumor-bearing hosts especially after prophylactic application.

Key words: bacterial CpG DNA, delayed type hypersensitivity, anticancer effect, cytotoxic activity of blood serum.

УДК 615.21.03

С. В. Павлов

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO МИТОПРОТЕКТИВНОЙ И НЕЙРОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО 1,4 БЕНЗОДИАЗЕПИНА – ЦИНАЗЕПАМА

В связи с ростом числа церебральных патологий, поиск новых нейропротективных лекарственных средств остается актуальным [1, с. 74 – 81; 2, с. 58 – 65].

В последнее время в литературе появились сведения, о том, что ГАМК-эргическая система может влиять на улучшение когнитивных процессов, а именно памяти и обучаемости. Как известно, влияние препаратов бензодиазепиновой структуры на способность к обучению и на процессы памяти неоднозначно [3, с. 82 – 92]. Есть данные о том, что под влиянием некоторых бензодиазепиновых транквилизаторов в низких дозах происходит улучшение этих процессов. Рядом экспериментальных исследований установлено, что среди производных 1,4-бенздиазепинового ряда наиболее широкий спектр нейротропной активности обладал циназепам, который в интервале дозы 1 – 10 мг/кг проявлял выраженные противосудорожные, антидепрессивные, ноотропные эффекты [4, с. 18 – 22; 5, с. 252]. Кроме того, установлено, что в дозе 0,5 мг/кг циназепам обладал и антигипоксическими свойствами [6, с. 522 – 523]. В связи с этим дальнейшее исследование нейропротективных свойств производного 1,4 бензодиазепина – циназепама представляется интересным, что открывает перспективы дальнейшего расширения отраслей его применения и внедрения в клиническую практику.

Известно, что развитие церебральных патологий сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления в тканях головного мозга. Под действием активных форм кислорода (АФК) (супероксидрадикал, пероксонитрит) происходит открытие митохондриальных пор, экспрессией и выходом в цитозоль проапоптических белков [7, с. 23 – 29; 8, с. 20 – 26; 9, с. 24 – 31]. Открытие митохондриальных пор происходит за счет окисление