

Антиинфекционное, антитоксическое и антипаразитарное действие экзогенной ДНК

Н. Н. БЕСЕДНОВА, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН, Владивосток

Antiinfective, Antitoxic and Antiparasitic Effects of Exogenic DNA

N. N. BESEDNOVA, T. S. ZAPOROZHETS

Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Science, Vladovostok

Характерной особенностью современной инфекционной патологии является рост числа хронических инфекционно-воспалительных заболеваний разнообразной этиологии и локализации, вызываемых слаботоксическими оппортунистическими микроорганизмами, обладающими множественной антибиотикоустойчивостью. Появились новые инфекции, выросла заболеваемость «старыми» инфекционными болезнями. Одной из главных причин изменения «лица» инфекционной заболеваемости является снижение иммунологической резистентности организма [1]. В этих условиях этиотропная химиотерапия без применения других способов лечения не позволяет справиться с растущей инфекционной заболеваемостью. У лиц с пониженным антиинфекционным иммунитетом антибактериальные, противовирусные и противогрибковые средства оказываются неэффективными.

В связи с этим модулирование иммунного ответа является одним из главных направлений создания на основе природных биологически активных веществ новых иммунотерапевтических средств — иммунокорректоров, противовирусных, антибактериальных и антипаразитарных средств, которые действовали бы на факторы как врождённого, так и приобретённого иммунитета. Одним из таких природных биополимеров является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) про- и эукариотов.

Долгое время считали, что ДНК эукариотов иммунологически инертна. Так, образцы ДНК, полученные из 10 различных видов позвоночных (молоки лосося, гонады сельди, печень форели, печень кур, плацента человека, тимус телят, печень мышей, кроликов и свиней), а также из разных видов растений (рис, томаты, шпинат и петрушка), не проявляли иммунологической активности [2]. Напротив, ДНК, экстрагированная из таких

микроорганизмов, как *Micrococcus lysodeikticus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Escherichia coli* и *Mycoplasma pneumoniae*, значительно увеличивала активность НК-клеток и индуцировала синтез интерферона. Биологическая активность ДНК из *Clostridium perfringens* была относительно слабее, но также статистически значима.

Более низкая иммуностимулирующая активность или даже её отсутствие в ряде случаев у ДНК эукариотов получила объяснение. Оказалось, что эту активность бактериальной ДНК определяет присутствие в её составе неметилированных последовательностей цитозина-гуанина CG [3,4]. В геноме позвоночных от 60 до 90% CpG являются метилированными по цитозину. Этим объясняют более низкую иммуностимулирующую активность CpG-ДНК эукариотов [5]. В бактериальной ДНК оптимальным иммуностимулирующим мотивом является $R_1R_2CGY_1$, где R_1 — пурин (предпочтительно G), R_2 — пурин или T, а Y_1 — пиримидины. Было показано [5], что в геноме позвоночных частота CpG-динуклеотидов намного ниже таковой в геноме бактерий. Более низкую иммуногенность ДНК позвоночных обуславливает также тот факт, что большинство цитозиновых остатков и особенно цитозинов в составе CpG-мотивов являются метилированными. Высокополимерную ДНК или её короткие последовательности с неметилированными CpG-динуклеотидами, имеющие выраженное стимулирующее влияние на иммунную систему, стали называть иммуностимулирующими CpG-ДНК. В большинстве бактериальных геномов, где они присутствуют в неметилированной форме, CpG-димеры определяются с ожидаемой частотой — 1/16. В геноме позвоночных CpG-динуклеотиды представлены с частотой 1/4 и являются метилированными. Метилирование ДНК — это модификация молекулы ДНК без изменения её нуклеотидной последовательности. При этом происходит присоединение метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции N5 пиримидинового кольца. Метилирование ДНК присуще эукариотам. У человека метилиро-

© Н. Н. Беседнова, Т. С. Запорожец, 2010

Адрес для корреспонденции: 690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН

вано около 1% геномной ДНК. В соматических клетках взрослого организма метилирование ДНК обычно происходит в CpG-динуклеотидах. Метилирование вне этих динуклеотидов встречается в эмбриональных стволовых клетках [6].

Однако метилирование CpG-динуклеотидов — не единственная причина различий иммуностимулирующих свойств ДНК бактерий и позвоночных. Так, молекулы ДНК позвоночных, которые были полностью деметилированы из-за «нокаута» гена ДНК-метилтрансферазы, не приобретали иммуностимулирующих свойств [7]. По-видимому, кроме метилирования, стимулирующие эффекты CpG-динуклеотидов определяет и какой-то другой фактор.

Позднее было показано, что ДНК позвоночных содержит небольшое количество потенциальных иммуностимуляторных CpG-мотивов. При этом свойства бактериальной ДНК как иммуномодулятора определяются последовательностью нуклеотидов [8].

Механизм антиинфекционного, антиоксидантного и антипаразитарного эффектов экзогенной ДНК про- и эукариотов связан с активацией факторов врождённого иммунитета, а также с тем, что она направляет иммунный ответ организма по Th1-пути [4, 9].

CpG-ДНК — потенциальный индуктор созревания дендритных клеток животных и человека, а также цитокинов, продуцируемых Th1 клетками. ДНК повышает способность дендритных клеток к презентации антигенов, повышает уровень костимуляторных молекул (CD40, B7-1, B7-2) и молекул адгезии ICAM-1 [10], усиливает и ускоряет дифференцировку В-лимфоцитов в антителопродуцирующие плазматические клетки [11].

CpG-ДНК, а также семейство цитозин-гуанин дезоксинуклеотидов (cytosine-guanine prepeat (CpG) dideoxynucleotides) [12, 13] являются агонистами TLR9. Toll-like рецепторы лейкоцитов способны обеспечить активацию клеток после взаимодействия практически с любым типом патогенов. При этом распознавание микробных продуктов с помощью этих рецепторов приводит к индукции собственных иммунных механизмов в виде антигенспецифического адаптивного иммунного ответа [14].

В качестве стимулятора Th1 иммунного ответа CpG-ДНК и CpG-ОДН (олигодезоксинуклеотид) повышают секрецию I типа интерферона (α , β), активируют NK-клетки и CD8+ Т-лимфоциты [4, 9]. Получены варианты, которые в системах *in vitro* и *in vivo* активируют разные иммунокомпетентные клетки и индуцируют синтез разных цитокинов. Синтетический препарат содержит неметилированный мотив, присущий только бактериальной ДНК.

При любом способе введения CpG-ДНК или CpG-ОДН защищают организм от заражения

многими вирусами и бактериями (даже особо опасными, как вирус Эбола, *Francisella tularensis* или *B.antracis*).

CpG-ДНК может иметь терапевтическое значение и как иммуномодулятор, и как адъювант для вакцин против ряда патогенов. Во втором случае они действуют как активаторы непосредственно на иммунокомпетентные клетки, прежде всего, на антигенпрезентирующие, и активизируют формирование адаптивного иммунитета [15, 16].

Обнаружение адъювантных свойств у CpG-ДНК значительно повысило интерес ученых к созданию синтетических ОДН, которые дифференцированно активируют IL-12 без продукции IFN α в антигенпрезентирующих клетках. При этом такие ОДН лишены неблагоприятных побочных эффектов бактериальной ДНК.

В настоящее время в клинической практике и в научных исследованиях часто используют синтетические CpG-олигодезоксинуклеотиды трёх модификаций: фосфодиэфирные, фосфотиоатные и смешанные. Существуют различные классификации этих веществ. По одной из них [17, 18] CpG разделяют на типы A, B, C, D и K. CpG-мотивы A и D стимулируют продукцию IFN α , активируют NK-клетки, подавляют рост опухоли [18]. CpG-мотивы типов B и K стимулируют антигенпрезентирующие клетки, активируют и вызывают пролиферацию В-лимфоцитов [19, 20]. CpG-мотивы типа C способны вызывать синтез интерферонов I типа (IFN α/β) и значительную стимуляцию В-лимфоцитов [17, 18].

Эффективность ДНК при бактериальных инфекциях. Даже однократное введение животным бактериальной CpG-ДНК создает 15-30-дневную защиту против смертельной дозы факультативных внутриклеточных паразитов *Listeria monocytogenes*, *F.tularensis*, *Plasmodium malaria* и др. [4]. Что же касается инфекций, вызываемых внеклеточными бактериями, то некоторые авторы [21] не получили в этом случае защитного эффекта ДНК. Однако в других работах, в том числе и в наших, получены иные данные. Так, было установлено, что пероральное введение ДНК из молока лососей мышам за сутки до заражения их внеклеточным микроорганизмом *Escherichia coli* позволяет животным противостоять развитию инфекционного процесса [22]. Выживаемость их при этом составила 60% при гибели всех мышей в контрольной группе. Несколько выше (65%) этот показатель был в группе животных, получивших ДНК двукратно — накануне и в день заражения. Многократное введение ДНК не увеличивало протективную активность препарата.

Инфицирование мышей, не получавших ДНК, возбудителем синегнойной инфекции *Pseudomonas aeruginosa* (контрольная группа) со-

проводилось гибелью 100% животных. Введение ДНК позволило сохранить 38,2% мышей.

S. Gomis и соавт. [23] установили протективную активность CpG-ДНК при инфицировании кур-бройлеров культурой *E.coli*. Выживаемость птиц контрольной группы, не получавших CpG-ДНК, составила всего 15%, в то время как для птиц, получивших препарат, этот показатель составил 65%.

В экспериментах [24] было установлено, что бактериальная CpG-ДНК предохраняет крыс от инфекционного мастита, вызванного *Staphylococcus aureus*. Для воспроизведения мастита в грудную железу крыс через 72 часа после родов инокулировали суспензию, содержащую 2×10^3 /мл (1-я группа) или 2×10^5 /мл (2-я группа) микробных тел стафилококка. Контрольным животным вводили 100 мкл 0,85% раствора NaCl. Через сутки после инфицирования крыс усыпляли. В первой группе животных гистопатологические изменения в грудных железах были умеренными, в то время как во второй группе наблюдались отчетливо выраженные структурные изменения. Альвеолы были заполнены нейтрофилами. В ткани грудной железы заметно возрастали уровни IL-6, TNF α , а также N-ацетил- β -глюкозаминидазы (NAGase). В следующей серии экспериментов крысам внутримышечно сразу после родов вводили CpG-ДНК. Через 72 часа животные контрольной группы получали 100 мкл 0,85% раствора NaCl. Крысам опытной группы в грудную железу инокулировали *S.aureus* в дозе 2×10^5 микробных тел/мл. В сроки: 0, 8, 24, 48 и 72 часа после введения стафилококка по 6 животных из каждой группы усыпляли и исследовали гистопатологические изменения в их грудных железах. У мышей, получавших ДНК, в начальном периоде инфекционного процесса наблюдали более быструю и интенсивную, чем у контрольных животных, миграцию полиморфноядерных лейкоцитов из крови в ткань железы, стимуляцию секреции IL-6, TNF α , а также снижение активности NAGase. Эти результаты свидетельствуют об эффективности CpG-ДНК в защите крыс от мастита, вызванного *S.aureus*.

Олигодезоксинуклеотиды (CpG-ОДН) стимулируют протективный иммунитет к легионеллёзу [25]. Эксперименты на мышах, в том числе TLR-/-, показали, что этот эффект обусловлен взаимодействием CpG-ОДН с TLR9.

В одной из последних работ K. L. Elkins и соавт. [26] показали, что у мышей, получавших бактериальные ОДН, содержащие неметилированные CpG-мотивы, формировалась временная защита против заражения летальной дозой внутриклеточных бактерий живого вакцинного штамма *F.tularensis*. В инфицированных возбудителем

туляремии макрофагах животных, получавших CpG-ОДН, было подавлено размножение бактерий, НК-клетки этих мышей продуцировали значительно больше IFN γ и TNF α , результатом чего было усиление продукции оксида азота и подавление репликации бактерий.

Хорошие результаты дала комбинация CpG-ОДН с сибиреязвенной вакциной (FVA, лицензированная вакцина для иммунизации людей). При этом увеличивается скорость образования антител, их титр и авидность. IgG антитела против сибиреязвенного протективного антигена защищают от заражения возбудителем сибирской язвы мышей, морских свинок и макак-резус [27]. Не менее эффективно применение в качестве адъюванта конъюгата CpG-ОДН с нетоксичной субъединицей В холерного токсина (СТВ). Такой конъюгат стимулирует более высокие титры провоспалительных цитокинов и хемокинов клетками мышинной селезенки. Иммуностимулирующий эффект комплекса осуществляется через TLR9-MyD88 и NF-kB зависимый путь.

Повышение показателей выживаемости при экспериментальном полимикробном сепсисе среди мышей, получавших CpG-ОДН, наблюдали H. Weighardt и соавт. [28]. При этом имела место быстрая аккумуляция нейтрофилов в первичном очаге инфекции, возрастала фагоцитарная активность нейтрофилов и увеличивалась продукция метаболитов реактивного кислорода. Эти результаты свидетельствуют о том, что повышение протективного иммунитета при введении CpG-ОДН кроме прочих факторов может быть связано с накоплением в первичном очаге клеток-эффекторов врожденного иммунитета.

Listeria monocytogenes представляет собой адекватный объект для изучения механизмов клеточного иммунитета, а листериоз является одной из старейших иммунологических экспериментальных моделей. На этой модели инфекционного процесса с формированием иммунного ответа клеточного типа было показано ключевое значение нейтрофилов и лимфоцитов в инициации защитных механизмов на начальных стадиях заболевания [29].

По данным A. M. Krieg и соавт. [30], у получивших бактериальную ДНК или синтетические CpG-ОДН мышей наблюдалось быстрое повышение продукции IL-12 и IFN γ . Сывороточный уровень IL-12 снижался на 8-й день после одной инъекции CpG-ОДН, но IFN γ возвращался к исходным цифрам через сутки. Th1 цитокиновый ответ индуцировал состояние резистентности к заражению вирулентными листериями чувствительных к ним безмикробных мышей линии BALB/c. Резистентность развивалась в течение 48 часов после введения CpG-ОДН, снижалась в течение двух недель и коррелировала с уровнем IFN γ .

Установлено [31], что CpG-ОДН значительно усиливают резистентность новорожденных мышей к заражению листериями. По данным этих авторов, дендритные клетки 3-дневных мышей отвечают на введение CpG-ОДН увеличением продукции $IFN\gamma$, IL-12 и/или $TNF\alpha$. Клетки селезенки новорожденных мышей, получивших CpG-ОДН, продуцировали значительное количество цитокинов и оксида азота, которые *in vitro* губительно действовали на листерий. Такие животные на длительный срок были защищены от последующего заражения этим возбудителем. У них обнаруживались антигенспецифические CD4 и CD8 Т-лимфоциты. Близкие результаты получены К. J. Ishii и соавт. [32]. Однократное пероральное введение 200 мкг CpG-ДНК защищает мышей Balb/c от перорального заражения вирулентными листериями, даже если оно имело место за 48 ч — 7 дней до этого. Бактериальная нагрузка на печень и селезенку снижалась при этом в 10—100 раз [33]. Есть данные о том, что CpG-ОДН индуцируют защиту против экспериментального листериоза путем антигеннезависимой активации макрофагов и дендритных клеток и именно это обеспечивает адъювантную активность этих биополимеров [34].

В нашей лаборатории исследовано действие низкомолекулярной ДНК из молок лососей на течение и исход экспериментальной листериозной инфекции [35]. Эксперименты были проведены на неинбредных мышах (массой 14–16 г), которым вводили *L. monocytogenes* (штамм 253/2) в дозе 1 LD_{100} (10^7 микробных тел на мл). Лечебная схема включала в себя инъекции ДНК через час после заражения, через 1, 2 и 3 суток. В соответствии с профилактической схемой животные получали ДНК в течение 6 дней до заражения. Оценивали эффективность различных доз ДНК (1, 10 и 100 мг/кг) и схем введения по проценту выживших животных и средней продолжительности жизни (СПЖ) мышей контрольной (вместо ДНК животные получали 0,85% раствор NaCl). Выживаемость и СПЖ мышей, зараженных листериями и получавших ДНК, превышали таковые у животных контрольной группы почти в 3 раза. При этом лечебная схема введения ДНК была более эффективной, чем профилактическая. Так, выживаемость и СПЖ мышей, получавших ДНК по лечебной схеме, значимо превышали (в 4,7 и в 2 раза) аналогичные показатели мышей контрольной группы. Статистически значимые результаты были получены при инокуляции ДНК через час и через двое суток после заражения. Выживаемость мышей по сравнению с контролем увеличилась соответственно в 6,7 и 7,3 раза, а СПЖ — в 2,4 и 2,7 раза.

Большое значение в патологии человека в настоящее время имеют хламидии, уреаплазмы и

микоплазмы, которые в большинстве случаев передаются половым путем и могут быть причиной бесплодия. Лечение таких пациентов длительное и требует применения различных лекарственных средств. Методы профилактики при этих инфекциях не разработаны. Поэтому поиск новых эффективных средств лечения и профилактики хламидиозов очень актуален. В последние годы в этом вопросе появились интересные и обнадеживающие результаты. Иммунизация мышей интраназально или интраперитонеально хламидийным протеазоподобным фактором CPAF вместе с CpG-ОДН индуцировала синтез $IFN\gamma$ и подъем уровня специфических антител в сыворотках крови, а также увеличивало продукцию вагинального sIgA и уменьшало воспалительную инфильтрацию тканей половых путей животных. Все это приводило к быстрому очищению организма от хламидий и формировало антихламидийный иммунитет [36].

Для лечения больных с инфекционной патологией мочеполового тракта, обусловленной хламидиями, использовали деринат (натриевую соль ДНК из молок осетровых рыб) [37]. Применение дерината было эффективным как при повторном заражении, так и при рецидивах болезни. Благодаря высокой иммуномодулирующей активности деринат может быть необходимым компонентом повторных курсов антибиотикотерапии. Применение дерината в этом случае снижало токсическое действие антибиотикотерапии.

CpG-ОДН, введенные одновременно с интраназальным заражением мышей Balb/c микобактериями туберкулеза, снижали размножение бактерий и уменьшали воспалительный процесс в ткани легкого, а также повышали уровень $IFN\gamma$ и усиливали способность спленоцитов продуцировать цитокины Th1 типа [38]. CpG-ОДН подавляли рост *Mycobacterium avium* в мышинных и человеческих макрофагах [39]. Хорошие результаты получены при использовании CpG-ОДН в качестве адъюванта при вакцинации против туберкулеза [38, 40].

Действие ДНК и CpG-ОДН при паразитарных болезнях. Эффективность ДНК и CpG-ОДН с положительными результатами исследована и при паразитарных болезнях, в основном, в качестве адъювантов вакцин. Так, P. S. Walker и соавт. [21] сообщают о получении антилейшманиозной вакцины путём последовательного замораживания-оттаивания лейшманий, в качестве адъюванта при этом использовали синтетические CpG-ОДН. У 40% мышей, получавших вакцину вместе с CpG-ОДН, формировалась невосприимчивость к последующему заражению их живыми лейшманиями. Еще более высокие показатели выживаемости животных были получены при введении лейшманий с последующей инокуляцией CpG-

ОДН. Выживаемость в этом случае составила 65–95%. Авторы связывают защитный эффект CpG-ОДН со значительным повышением уровня ИЛ-12 и ИФН γ в сыворотке крови животных.

В экспериментах на чувствительных (Balb/c) и резистентных (C57BL/6) к лейшманиям мышам показано, что введение автоклавированного лейшманиозного антигена с CpG-ОДН значительно ослабляет проявления патологического процесса. К тому же мыши (C57BL/6) были защищены от лейшманий на 6 месяцев после иммунизации. Период защищенности от инфекции совпадал с периодом увеличения в крови Th1 клеток и CD8 $^{+}$ лимфоцитов. Отсутствие эффекта иммунизации было отмечено у мышей, дефицитных по CD8 $^{+}$ лимфоцитам [41].

Эксперименты на макаках-резус, больных лейшманиозом и инфицированных вирусом HIV, показали, что введение CpG-ОДН приводило к снижению паразитарной нагрузки лейшманиями как у нормальных, так и у зараженных вирусом HIV обезьян [42].

Системное применение CpG-ОДН типа D за 3 дня до и через 3 дня после заражения макак *Leishmania major* создавало высокую резистентность животных при внутрикожном введении возбудителя, а также купировало тяжёлые морфологические изменения в органах. Авторы этого исследования [43] характеризовали CpG-ОДН типа D как биологически активное вещество иммунопротективного и терапевтического действия. Такие результаты открывают перспективы применения олигодезоксинуклеотидов как у пациентов с лейшманиозом, так и у пациентов с суперинфекцией HIV.

М. Tafagodi и соавт. [2008] в качестве системы доставки для автоклавированного антигена лейшманий и адъюванта CpG-ОДН предложили наносферы PLGA молекулярной массой 30000 Да [44]. Авторы установили, что большое значение в проявлении иммуностимулирующего эффекта имеют средние размеры наночастиц. Препараты, ассоциированные с частицами менее 10 мкм в диаметре, оказывали прямое действие на макрофаги и дендритные клетки через фагоцитоз, тогда как при использовании более крупных частиц они фагоцитировались только после биодеградации. Перспективной стратегией повышения уровня Th1 иммунного ответа при лейшманиозе может быть использование комплекса липосомы-CpG-ОДН-рекомбинантный растворимый лейшманиозный антиген. Введение мышам такого комплекса существенно уменьшало число живых паразитов в селезёнке. При этом в группах животных, получавших только антиген или только CpG-ОДН, число паразитов в этом органе было больше. У мышей, получивших комплекс антиген-липосомы-CpG-ОДН, уровень IgG2a антител

и соотношение IgG2a/IgG1 в сыворотке крови были существенно выше. У мышей, иммунизированных комплексом липосомы-антиген, уровень IgG1 был значительно ниже, чем у животных, иммунизированных комплексом липосомы-антиген-CpG-ОДН или только антигеном+CpG-ОДН. Липосомы защищали CpG-ОДН от разрушения нуклеазами, тормозили распространение CpG-ОДН в тканях и облегчали доставку CpG-ОДН в цитоплазму клеток, а в дальнейшем ускоряли презентацию антигена

Entamoeba histolytica вызывает у человека кишечную паразитарную инфекцию, сопровождающуюся колитом и образованием абсцессов в печени. Ежегодно в мире она уносит около 50000 жизней. Поэтому получение эффективной вакцины для защиты от этой паразитарной инфекции является очень актуальной проблемой. Разработанная вакцина [45], представляющая собой галактозоспецифичный лектин (белок из вирулентного паразита). В качестве адъюванта были использованы CpG-ОДН. Введение вакцины с адъювантом приводило к усилению продукции специфичных к Gal-лектину Т-лимфоцитов и ИФН γ . В сыворотке крови вакцинированных животных определялись лектиноспецифичные IgG и IgA, способные *in vitro* блокировать адгезию паразита на клетках-мишенях. Вакцина стимулировала как местный, так и системный иммунный ответ.

При экспериментальном токсоплазмозе [46], вызванном *Toxoplasma gondii*, несмотря на выраженный иммунный ответ (появление специфических антител, повышение уровня ИФН γ и ИЛ-4 в сыворотках крови), не было получено длительной защиты экспериментальных животных от вирулентных *T.gondii*. Кратковременная защита была отмечена лишь при внутрибрюшинном введении мышам Balb/c CpG-ОДН с последующим заражением животных вирулентным штаммом *T.gondii*.

В связи с неполноценностью иммунной системы новорожденные дети очень подвержены инфекционным заболеваниям. В частности, достаточно часто у них регистрируются заболевания, возбудителем которых являются кишечные паразиты *Cryptosporidium parvum*. В экспериментах на новорожденных мышам было показано, что внутрибрюшинное введение животным содержащих и не содержащих CpG-мотивы олигодезоксинуклеотидов за 24 часа до инфицирования их *C.parvum* снижают паразитарную нагрузку на 80–95% к 6-му дню после инфицирования [47]. Авторы предполагают, что контроль над инфекцией, вызванной *C.parvum*, в организме новорожденных осуществляется по двум механизмам: 1) хорошо известным путем — через взаимодействие с TLR9, что ведет к стимуляции продукции цитокинов и активации лимфоцитов. 2) с помощью неизвестного механизма, который не зависит от TLR9 и осуществляется при оральном пути заражения.

Был продемонстрирован положительный эффект применения коротких ОДН, содержащих неметилованные CpG-мотивы, в качестве адьюванта при вакцинации домашней птицы против кокцидиоза [48]. Это тяжёлое паразитарное заболевание ежегодно наносит значительный урон сельскому хозяйству. Дезоксинуклеотиды в комплексе с рекомбинантной вакциной повышали резистентность цыплят к заражению *Eimeria* и уровень антител в сыворотках крови к паразитам. Эффект зависел от линии цыплят (SC или ТК), дозы ОДН, а также от способа введения адьюванта [48].

Антитоксическое действие нуклеиновых кислот.

Одним из ведущих в патогенезе ряда инфекционных заболеваний является инфекционно-токсико-аллергический синдром. Токсины как факторы патогенности бактерий наряду с адгезинами, инвазинами и биомолекулами, обеспечивающими устойчивость микроорганизмов к действию защитных факторов иммунной системы теплокровного организма, играют значительную роль в развитии и исходе инфекционного процесса. Одни из них могут быть главными факторами патогенности микроорганизмов, вызывая развитие характерной для болезни клинической картины, другие — вспомогательными, участвующими в развитии определенных патологических синдромов.

Препараты нуклеиновых кислот различного происхождения повышают антитоксическую резистентность организма. ДНК из тимуса крупного рогатого скота, ДНК из сельди и дрожжевая РНК в экспериментах *in vivo* на морских свинках оказывали протективное действие при дифтерийной интоксикации. Антитоксический эффект препаратов был дозозависимым и выраженным как в случае предварительного инкубирования, так и одновременного введения их с токсином. Результаты исследования с помощью реакции преципитации свидетельствовали о связывании токсина с препаратами ДНК и РНК и о специфическом взаимодействии связанного токсина с дифтерийным анатоксином [49].

На модели интоксикации, обусловленной термолabileм и термостабильным токсинами *Yersinia pseudotuberculosis* были проведены исследования антитоксического действия ДНК из моллюсков дальневосточного лосося [50]. Автор использовал профилактическую и лечебную схемы введения ДНК в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Профилактическое введение ДНК мышам *per os* предотвращало летальное действие обоих токсинов, которые вводили внутривенно. В группах мышей, которые получали ДНК за сутки до введения токсинов и одновременно с их введением, выживали 100% животных при гибели 100% мышей в контрольной группе. В случае введения ДНК через 1 и 3 часа от момента введения токсина выживали 66,7±23,5% животных. Под действи-

ем ДНК возрастала резистентность нейтрофилов перитонеальной полости к действию токсинов возбудителя псевдотуберкулеза. С учётом того, что фагоцитарная активность макрофагов также повышается под действием ДНК, можно считать, что макрофаги и нейтрофилы играют значительную роль в защите организма от воздействия токсина, тем более что фагоциты являются одной из мишеней действия многих бактериальных токсинов. Следует учитывать и исходный состав ДНК, используемой в экспериментах. В зависимости от того, какие нуклеотидные последовательности составляют структуру ДНК — по их качественному и количественному составу, содержанию азотистых оснований, размерам и зависимости от места их расположения в цепи — могут наблюдаться те или иные воздействия.

Действие ДНК и CpG-ОДН при вирусных инфекциях. Одной из актуальнейших проблем в современной медицине является борьба с вирусными болезнями, прочно удерживающими в настоящее время первое место в инфекционной патологии человека. Известно около 500 вирусов, способных вызвать заболевание у человека, при этом практически каждый случай инфекционной болезни, обусловленной вирусами, сопровождается формированием иммунодефицитного состояния. Возможности практической медицины в борьбе с вирусными инфекциями пока ещё очень ограничены. Вакцинопрофилактика с успехом применяется только в отношении немногочисленной группы вирусов — возбудителей тяжёлых массовых заболеваний (полиомиелита, кори и др.). Химиотерапия также не приводит к достаточно успешным результатам в лечении вирусных инфекций. Многолетние трудоёмкие поиски антивирусных средств привели лишь к созданию единичных химиопрепаратов преимущественно узкого спектра действия.

В связи с этим остается актуальной разработка возможностей фармакологического контроля вирусных инфекций. Одним из перспективных направлений на этом пути является иммунокоррекция. В качестве потенциальных антивирусных агентов рассматриваются морские гидробионты, содержащие уникальные химические соединения.

Перспективным подходом к разработке методов противовирусной терапии является использование для этой цели ДНК, ОДН, антисмысловых олигонуклеотидов и их производных, комплементарных последовательностям генома соответствующего агента.

Одними из самых популярных объектов изучения воздействия ДНК и дезоксинуклеотидов, которым посвящено достаточно много работ, являются ретровирусы (преимущественно вирус иммунодефицита человека) и вирусы группы герпеса. Противовирусная активность ДНК уста-

новлена в отношении ВИЧ-1, цитомегаловируса, а также вируса простого герпеса. В последнем случае отмечен, кроме того, защитный эффект ДНК на животных, сравнимый с защитным действием индуктора интерферона — ридостина, который используется в настоящее время в качестве противогерпетического препарата. Описано прямое антивирусное действие CpG-ОДН по отношению к цитомегаловирусу (ингибирование проникновения и репликации вирусных частиц), которое наблюдалось на культурах фибробластов и клеток эндотелия [51]. При этом результаты, полученные *in vitro*, были подтверждены экспериментами *in vivo* на животных с острой цитомегаловирусной инфекцией. Эти данные представляют особый интерес в связи с острой проблемой расширения арсенала терапевтических средств для лечения цитомегаловирусной инфекции, вызывающей развитие тяжёлых патологических проявлений у беременных женщин и больных с дефектами иммунной системы, а также герпетической инфекции. Следует заметить, что обе эти болезни часто встречаются у ВИЧ-инфицированных лиц, они сокращают период бессимптомного вирусоносительства и ускоряют появление тяжёлых клинических признаков СПИДа.

Курсовое применение препарата ферровира (1,5% раствор натриевой соли ДНК из молок осетровых рыб+Fe³⁺) при комплексной терапии СПИД/ВИЧ-инфекции повышает уровень CD4+ лимфоцитов в крови, который сохраняется 1—1,5 месяца после курса лечения. Одновременно снижается вирусная нагрузка в организме.

В качестве адъюванта при интраназальной вакцинации мышей рекомбинантным гликопротеином В против экспериментальной герпесвирусной инфекции, вызванной HSV-1, были использованы синтетические ОДН. Это приводило к значительному повышению уровня IgG и IgA в сыворотках крови и вагинальном смыве животных. Кроме того, у мышей, получивших вакцину с CpG-ОДН, в течение нескольких дней после заражения наблюдался низкий уровень репликации вируса. Заболевания половых путей, связанные с HSV-2, являются фактором риска ВИЧ-1, а 75% ВИЧ-инфицированных лиц инфицированы еще и HSV-2 [52]. Положительные результаты экспериментов открывают перспективы разработки эффективных лекарственных препаратов для защиты организма от возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, в том числе от ВИЧ. Применение CpG-ОДН при генитальном герпесе является очень перспективной стратегией в борьбе с заражением этой болезнью [53].

При рецидивирующей герпетической инфекции применение таких отечественных средств, как ферровир и деринат сокращает продолжительность рецидива и приводит к длительной ремиссии.

В случае острых прогрессирующих болезней терапия путём активации агонистами TLR9 чаще бывает безрезультатной. Терапия путем активации TLR эффективна при разработке стратегии лечения хронических вирусных инфекций, например, гепатита С или В [4, 55]. У мышей, больных гепатитом В, наблюдалось заметное снижение вирусной нагрузки. У мышей, генетически дефектных в отношении рецептора IFN 1-го типа, экспрессия вируса гепатита В не наблюдается, что наводит на мысль, что антивирусный эффект CpG-терапии обусловлен секрецией IFN γ , индуцированной CpG-ДНК. Возможно, эта секреция осуществляется дендритными клетками.

В работе [56] показано, что катионные липосомы с рекомбинантным белком NS3 и CpG-ОДН индуцировали выраженный иммунный ответ к HCV NS3 и направляли иммунный ответ по Th1 пути, индуцировали высокие титры иммуноглобулинов G, при этом преобладающим был IgG2a. Анализ цитокинового профиля показал, что уровень цитокинов, продуцируемых лимфоцитами Th1, был значительно выше у животных, иммунизированных комплексом липосомы+rHCV NS3+CpG, чем у мышей, иммунизированных только вирусным антигеном. То же касалось и IL-12. Способность к переключению зависела от иммуномодулирующего эффекта CpG-ОДН и способности липосом доставлять антиген и иммуномодулятор непосредственно в клетки. Поверхность липосом может связать большее число молекул CpG-ОДН в связи с электростатическим взаимодействием, что влечет за собой стимуляцию захвата липосом антигенпрезентирующими клетками. Кроме того, катионные липосомы с антигеном и CpG-ОДН индуцируют IL-12, необходимый для дифференцировки Th0 в Th1 клетки. Эту стратегию авторы предлагают для конструирования вакцины против гепатита С.

CpG-ОДН в будущем могут рассматриваться как потенциальные регуляторы иммунных реакций против HBV-инфекции. Основанием для этого являются исследования [4, 57]. В экспериментах *in vitro* авторы использовали мононуклеарные лейкоциты периферической крови больных хроническим гепатитом В и здоровых доноров. CpG-ОДН типа D, агонисты TLR9, оказывали ингибиторное действие на репликацию вируса гепатита В. Наиболее значительная секреция IFN γ , по сравнению с контролем, была получена на клетках больных гепатитом В пациентов. Наиболее впечатляющие результаты применения CpG-ОДН отмечены при хронических вирусных инфекциях, например гепатитах В или С. Комбинация таких препаратов, например, с ламивудином — ингибитором обратной транскриптазы — подавляет репликацию HBV [57].

Применение ферровируса у больных хроническим гепатитом С способствует снижению репликативной активности HCV и переводит процесс в латентную фазу.

СрG-ДНК и СрG-ОДН являются мощными адъювантами при вакцинации против гепатита В. Титры антител к антигену вируса гепатита ВВ в шесть раз выше, чем при использовании стандартного адъюванта (гидроокиси алюминия). В случае же одновременного использования этих двух адъювантов титры антител к HbsAg были в 35 раз выше, чем при использовании только гидроокиси алюминия. Стандартный адъювант индуцировал Th2 гуморальный ответ (IgG1). СрG-ОДН, наоборот, стимулировал Th1 ответ с преимущественной продукцией IgG2 [27].

СрG-ОДН оказывают антивирусное действие при экспериментальном гриппе, вызванном летальной дозой вируса гриппа А [54]. При профилактическом введении СрG-ОДН однократно в дозе 25 мкг за 5 дней до заражения выживали 40% мышей. Если же олигодезоксинуклеотиды были заключены в липосомы, то защитный эффект возрастал до 80%. Таким образом, лекарственные средства на основе липосомальных форм СрG-ОДН могут быть перспективными в качестве средств профилактики острых респираторных вирусных инфекций, атипичной пневмонии, гриппа птиц.

Отечественные лекарственные средства ферровирус и деринат являются перспективными для лечения такого опасного заболевания, как грипп птиц (возбудитель — вирус H5N1) [59]. Распространение гриппа птиц представляет реальную угрозу сельскому хозяйству. Кроме того, возрастает опасность появления нового пандемического штамма вируса гриппа человека. Авторы показали, что ферровирус и деринат, введенные за 1 час до заражения культур клеток СПЭВ вирусом гриппа птиц А в дозе 10 ТЦД₅₀, защищают 75% инфицированных вирусом клеток. Положительные результаты были получены и в случае одновременной с заражением аппликации ферровируса или дерината. Лечебная схема применения препаратов была неэффективна.

Ферровирус обладает выраженной противовирусной активностью не только по отношению к вирусам гриппа, иммунодефицита человека, гепатита, простого герпеса, но и японского энцефалита, энцефаломиокардита мышей и др. [59].

Эффективным оказалось применение СрG-ОДН при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом лимфоцитарного хориоменингита [34].

В экспериментах на новорожденных мышках исследованы защитные свойства СрG-ОДН по отношению к заражению животных нейротропными вирусами, в частности, вирусами *Tacaribe*

(группа ареновирусов). Выживаемость мышей, зараженных вирусом *Tacaribe*, которые получали олигодезоксинуклеотиды, повышалась на 52% при внутрибрюшинном и на 36% при интраназальном введении СрG-ОДН. Вирусная нагрузка у этих животных резко снижалась. Защитные свойства СрG-ОДН проявлялись при введении их не позже, чем через 3 дня после заражения вирусом. При этом повышался уровень антигенспецифических IgM и IgG, а также количество NO в сыворотке крови.

На модели клещевого энцефалита у мышей В. Я. Кармышева и др. показали, что механизм противовирусной активности ДНК может быть связан со стимуляцией иммунной системы, особенно тимуса и Т-зависимых элементов.

Причиной отсутствия иммунного ответа на прионы — возбудителей тяжёлых заболеваний (скрепи, губчатой энцефалопатии, болезни Крейтцфельда — Якоба) — может быть тот факт, что в их составе нет нуклеиновых кислот. Для стимуляции врождённого иммунитета у мышей, которым вводили гомогенаты мозга мышей, зараженных прионами — возбудителями болезни скрепи, использовали СрG-ОДН [60]. Продолжительность жизни зараженных прионами животных, получавших СрG-ОДН, увеличивалась на 38% при 100% гибели их в контрольной группе. Такой эффект, вероятно, обусловлен взаимодействием СрG-ОДН с TLR9, которое сопровождается стимуляцией клеток врождённого иммунитета (макрофагов, моноцитов, дендритных клеток).

В комплексной терапии геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) с успехом был применен отечественный препарат из молок осетровых рыб — деринат [61]. Применение дерината в качестве средства сопровождения базисной терапии ГЛПС позволило нормализовать лейкоцитарный индекс интоксикации, уровень молекул средней массы, индекс эндогенной интоксикации, сорбционную способность эритроцитов, концентрацию малонового диальдегида, а также увеличить активность каталазы, усилить синтез IgA и IgG, снизить уровень ЦИК к моменту поздней реконвалесценции.

Приведённые материалы позволяют заключить, что ДНК из различных объектов, а также дезоксинуклеотиды (природные и синтетические) могут быстро создавать неспецифическую защиту против различных патогенов (бактерий, вирусов, простейших). Эти биополимеры распознаются рецепторами системы врождённого иммунитета, взаимодействие с которыми в течение нескольких часов активирует эффекторную систему и запускает процессы, ведущие к элиминации патогенов и формированию протективного (адаптивного) иммунитета. Нема-

ловажное значение имеют адъювантные свойства ДНК, что может быть использовано при вакцинации организма слабоиммуногенными вакцинами или в тех случаях, когда у человека и животных недостаточно вырабатываются защитные антитела. ДНК прокариотов, а также ОДН могут войти в набор бактериальных антигенов, несущих панель патогенассоциированных молекулярных структур, которые являются лигандами для уже достаточно хорошо охарактеризованных TLR. Такая комбинация антигенов будет создавать быструю защиту не только от бактерий, но и от вирусов и может быть основой для разработки новых лекарственных средств противовирусного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаумов Р. М., Пинегин Б. В. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение. Иммунология 2003; 24: 4: 196—203.
2. Yamamoto S., Yamamoto T., Shimada S. et al. DNA from bacteria? But not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. Microbiol Immunol 1992; 36: 983—997.
3. Krieg A. M. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? Natur Med 2003; 9: 7: 831—835.
4. Krieg A. M. Antiinfective applications of Toll-like receptor 9 agonist. Amer Thoracic Society 2007; 4: 289—294.
5. Bird A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature 1986; 321: 209.
6. Dodge J. E., Ramsahoyeb B. H., Woa Z. G. et al. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cell: CpG versus non-CpG methylation. Gene 2002; 289: 1—2: 41—48.
7. Mitra S. K., Gupta M., Sarma D. N. Immunomodulatory effect of IM-133. Phytother Res 1999; 4: 341—343.
8. Cornelié S., Poulain-Godefroy O., Lund C. et al. Methylated CpG-containing plasmid activates the immune system. Scand J Immunol 2004; 59: 2: 143—151.
9. Kensuke M. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. Sem Immunol 2007; 19: 3—10.
10. Bandholtz L. C. DNA Vaccines and bacterial DNA in Immunity. Doctoral Thesis 2002; Stockholm. 44.
11. Vollmer J., Krieg A. M. Immunotherapeutic applications of CpG-oligodeoxynucleotides TLR9 agonist. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61: 3: 195—204.
12. Dorn A., Kippenberger S. Clinical application of CpG, non-CpG and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. Curr Opin Mol Ther 2006; 10: 10—20.
13. Jurk M., Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonist for immune modulation. Bio Drugs 2007; 21: 387—401.
14. Афанасьев С. С., Алешкин В. А., Байракова А. Л. и др. Молекулярные механизмы индукции врожденного иммунитета. Вестник РАМН 2009; 4: 42—49.
15. Mutwiri G., Gerdts V., Lopez M., Babiuk L. A. Innate immunity and new adjuvants. Rev Sci Tech Int Epiz 2007; 26: 1: 147—156.
16. Gupta K., Cooper C. A. Review of the Role of CpG ODN as Toll-like receptor-agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. Drugs in Rand D 2008; 9: 3: 137—145.
17. Gursel M., Verthelyi D., Gursel I. et al. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG ODN. J Leukoc Biol 2002; 71: 813—820.
18. Klinman D. M. Immunotherapeutic uses of CpG ODN. Nat Rev Immunol 2004; 4: 152—166.
19. Krieg A. M., Yi A. K., Matson S. et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature 1995; 374: 546—549.
20. Neujahr D. C., Pisetsky D. S. DNA as an adjuvant. Vaccine adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. 2000; 42: 299—313.
21. Walker P. S., Scharton-Kersten T., Krieg A. M. et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12 and IFN γ — dependent mechanisms. Med Scienc 1999; 96: 12: 6970—6975.
22. Беседнова Н. Н., Касьяненко Ю. И., Энштейн Л. М., Гажа А. К. Иммуностимулирующие свойства дезоксирибонуклеиновой кислоты. Антибиотики и химиотер 1999; 10: 13—15.
23. Gomis S., Babiuk L., Godson D. L. et al. Protection of chickens against coli infection by DNA containing CpG motifs. Infect Immun 2003; 71: 2: 857—863.
24. Zhu Y.-M., Miao J.-F., Fan H.-J. et al. Protective effect of CpG-DNA against mastitis induced by *Staphylococcus aureus* infection in a rat model. Intern Immunopharmacol 2007; 7: 4: 435—443.
25. Bhan U., Trjillo G., Lyn-Kew K. et al. Toll-like receptor 9 regulates the lung macrophage phenotype and host immunity in murine pneumonia caused by *Legionella pneumophila*. Infect Immunol 2008; 76: 7: 2895—2904.
26. Elkins K. L., Colombini S. M., Krieg A. M., De Pascalis R. NK cells activated *in vivo* by bacterial DNA control the intracellular growth of *Francisella tularensis* LVS. Microb Infect 2009; 11: 1: 49—56.
27. Klinman D. M., Xie H., Ivins B. E. CpG-ODN improve the protective immune response induced by the licensed anthrax vaccine. Ann NY Acad Sci 2006; 1082: 137—150.
28. Weighardt H., Feterowski C., Veit M. et al. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides in related to an enhanced innate effector cell response. J Immunology 2000; 165: 4337—4543.
29. Одинов Ю. Н., Перельмутер В. М. Последствия интернализации и фагоцитоза листерий при инфекционном процессе. Бюлл Сибирской мед 2003; 4: 120—126.
30. Krieg A. M., Love-Homan L., Yi A. -K., Harty J. T. CpG-DNA induces sustained IL-12 expression *in vivo* and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. J Immunology 1998; 161: 2428—2434.
31. Ito S., Ishii K. J., Gursel M. et al. CpG-ODN enhance neonatal resistance to *Listeria* infection. Ibid 2005; 174: 777—782.
32. Ishii K. J., Ito Sh., Tamura T. et al. CpG-activated Th1. 2+-dendritic cells protect against lethal *Listeria monocytogenes* infection. Eur J Immunol 2005; 35: 8: 2397—2405.
33. Ray N. B., Krieg A. M. Oral pretreatment of mice with CpG DNA reduces susceptibility to oral or intraperitoneal challenge with virulent *Listeria monocytogenes*. Infection Immunity 2003; 78: 8: 4398—4404.
34. Oxenius A., Martinic M. A., Hengartner H., Klenerman P. CpG-containing ODN are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccine. J Virology 1999; 73: 5: 4120—4126.
35. Федянина Л. Н. Иммуномодулирующая активность низкомолекулярной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из молок лососевых рыб (фундаментальные и прикладные аспекты). Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Владивосток. 2007; 46.

36. Cong Y., Jupelli M., Guentzel N et al. Intranasal immunization with chlamidial protease-like activity factor and CpG-ODN enhances protective immunity against genital *Chlamidia muridarum* infection. *Vaccine* 2007; 25: 5: 3773—3780.
37. Нестеров И. М., Толоян А. А. Иммунокорригирующая терапия инфекционно-воспалительных заболеваний женской половой сферы. СПб. 2007; 56.
38. Juffermans M. P., Leemans J. C., Florquin S. et al. CpG-ODN enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect Immun* 2002; 70: 1: 147—152.
39. Wang J. P., Hayashi T., Datta S. K. et al. CpG-ODN partially inhibit growth of *Mycobacterium tuberculosis* but not *Salmonella* or *Listeria*, in human monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 45: 2: 303—310.
40. Yamamoto S., Yamamoto T., Nojima Y. et al. Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 37—44.
41. Rhee E. G., Mendez S., Shah J. A. et al. Vaccination with heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG-ODN induced long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 2002; 195: 12: 1565—1573.
42. Verthelyi D., Gursel M., Kenney R. T. et al. CpG-ODN protect normal and SIV infected macaques on *Leishmania* infection. *Infect Immunol* 2005; 73: 8: 4948—4954.
43. Flinn B., Wang W., Sacks D. L. et al. Prevention and treatment cutaneous leishmaniasis in primates by using synthetic type D/A ODN expressing CpG motifs. *Infect Immunity* 2005; 73: 8: 4948—4954.
44. Tafagodi M., Tabassi A. S., Amiri N. PLGA Nanospheres loaded with autoclaved *Leishmania major* (ALM) and CpG-ODN: preparation and *in vitro* characterization. *Iranian J Basic Med Sci* 2008; 11: 2: 112—119.
45. Ivory P. A., Chadee K. Intranasal immunization with gal-inhibitable lectin plus an adjuvant of CpG-ODN protects against *Entamoeba histolytica* challenge. *Infection and Immunity* 2007; 75: 10: 4817—4922.
46. Saavedra R., Leyva R., Tenorio E. P. et al. CpG-containing ODN has a limited role in the protection against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 2004; 26: 2: 367—373.
47. Barrier M., Lacroix-Lamande S., Mancassola R. et al. Oral and intraperitoneal administration of phosphorotioate ODN leads to control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *J Infect Dis* 2006; 193: 10: 1400—1407.
48. Dalloul R. A., Lillehoj H. S., Okamura M et al. *In vivo* effect of CpG ODN on *Eimeria* infection in chickens. *Avian Dis* 2004; 48: 783—790.
49. Ходырев А. П. Влияние нуклеиновых кислот на исход острой стрептококковой инфекции. *Журн эпидемиол микробиол иммунобиол* 1974; 10: 70—74.
50. Павлович С. Н. Экспериментальное обоснование применения низкомолекулярной ДНК из молок лососевых рыб и напитков на натуральной основе с низкомолекулярной ДНК при псевдотуберкулезе: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Владивосток: 2006; 24.
51. Luganini A., Caposio P., Landolfo S., Grubaud G. Phosphorotioate-modified ODNs inhibit human cytomegalovirus replication by blocking virus entry. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 53: 3: 1111—1120.
52. Hook E. W., Cannon R. O., Nahmias F. F. et al. *Herpes simplex* virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. *J Infect Dis* 1992; 65: 251.
53. Harandi A. M. The potential immunostimulatory CpG-DNA for inducing immunity against genital herpes: opportunities and challenges. *J Clin Virol* 2004; 23: 207—210.
54. Wong J. P., Nagata L. P., Christopher M. E. et al. Prophylaxis of acute respiratory virus infections using nucleic acid-based drugs. *Vaccine* 2005; 23: 2266—2268.
55. Isogawa M., Robek M. D., Furuichi Y., Chisari F. V. Toll-like receptor signalling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* 2005; 79: 7269—7272.
56. Jiao X., Wang Y.-H., Qiu O. et al. Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *J General Virology* 2004; 85: 1545—1553.
57. Vincent I. E., Lucifora J., Durantel D. et al. Inhibitory effect of the combination of CpG-induced cytokines with lamivudine against hepatitis B virus replication *in vitro*. *Antivir Ther* 2009; 14: 1: 131—135.
58. Christopher M. E., Wong J. P. Broad-spectrum drugs against viral agents. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 1561—1594.
59. Носик Д. Н., Каплуна Э. Н. Применение препарата ферровир в лечении инфекционной патологии. М.: 2007; 79.
60. Wagner H., Kretzschmar H. Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* 2002; 360: 229—230.
61. Аришнцев Е. Г., Игнатьев В. Н., Шукин С. А. Деринат в комплексной терапии геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Новые технол диагн леч инфекц бол. VII Росс. съезд инфекц: Тез докл. 2006. Нижний Новгород. 2006; 225.