

Perspektywy immunoterapii chorób alergicznych

III. Zastosowanie preparatów bakteryjnych i elementów mikroorganizmów w profilaktyce i leczeniu alergii

Perspectives in immunotherapy of allergic diseases

III. Prophylactic and therapeutic application of bacteria and microbial products in allergology

prof. dr hab. n. med. Witold Lasek

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie: Kontakt z mikroorganizmami zarówno chorobotwórczymi, jak i niepatogennymi jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Wykładnikiem tego jest odpowiednie zbalansowanie czynności limfocytów pomocniczych Th1 i Th2. Różne drobnoustroje, a także pasożyty wielokomórkowe indukują odpowiedź immunologiczną, w którą preferencyjnie zaangażowane są limfocyty Th1 bądź Th2. Ponieważ w olbrzymiej większości chorób alergicznych związanych z nadprodukcją IgE aktywacja subpopulacji Th2 odgrywa dominującą rolę w etiopatogenezie, podejmowane są próby stosowania bakterii bądź elementów drobnoustrojów lub ich pochodnych działających aktywująco na subpopulację Th1 w celu zapobieżenia określonym schorzeniom alergicznym lub ich leczenia.

Abstract: Exposure to microorganisms, both pathogenic and nonpathogenic is necessary for correct function of the immune system and leads to properly balanced function of Th1 and Th2 lymphocytes. Contacts with pathogens, including multicellular parasites, may result in the preferential development of either Th1- or Th2-type immunity. In most allergies, Th2-mediated reactions and overproduction of IgE is the underlying cause of the disease. Therefore, in prevention or treatment of some allergic disorders, application of bacteria, their products or microbial elements, specifically triggering Th1-mediated response, can be beneficial.

Słowa kluczowe: immunoterapia, receptory TLR, preparaty bakteryjne, choroby alergiczne

Key words: immunotherapy, TLR receptors, microbial products, allergic diseases

W 1989 roku sformułowano hipotezę higieny (*hygiene hypothesis*), która próbuje tłumaczyć stopniowy wzrost zapadalności na choroby alergiczne w społeczeństwach krajów wysokorozwiniętych [35]. Zakłada ona, że przyczyną masowych zachorowań na alergię w skali populacji jest niedostateczny kontakt z czynnikami zakaźnymi

w wieku dziecięcym. W warunkach niewystarczającego oddziaływania mikroorganizmów, nie tylko patogennych, układ odpornościowy człowieka nie doświadcza odpowiedniego treningu, czego efektem jest niezbalansowana funkcja limfocytów pomocniczych Th1 i Th2 oraz niedostateczne wykształcenie limfocytów T regulatorowych. Limfocyty Th2, z braku odpo-

wiednich bodźców pozostają od urodzenia w przewodzie, co sprzyja alergizacji [42]. Na udział czynników infekcyjnych w ograniczaniu zapadalności na alergię wskazuje wiele faktów:

- w rodzinach wielodzietnych młodsze rodzeństwo rzadziej choruje na alergię niż starsze, co prawdopodobnie wynika z częstszego kontaktu młodszych braci i sióstr z patogenami przekazywanymi przez starsze rodzeństwo [35],
- przebycie niektórych chorób, np. odry, żółtaczki zakaźnej, bądź kontakt z prątkiem gruźlicy wiąże się z obniżonym ryzykiem zachorowania na alergię [21, 24, 28, 31, 32],
- w środowiskach wiejskich u dzieci wychowujących się w bliskim kontakcie ze zwierzętami gospodarskimi w związku z częstą ekspozycją na mikroorganizmy niepatogenne (bądź ich elementy) choroby alergiczne są relatywnie rzadkie [27],
- wzrastanie w warunkach częstego kontaktu z pasożytami wielokomórkowymi chroni przed chorobami alergicznymi [10],
- stosowanie antybiotyków we wczesnym dzieciństwie koreluje z ryzykiem zachorowania na astmę [45],
- u dzieci, które oddane były we wczesnym dzieciństwie do żłobka, alergię występują rzadziej.

Choć przeciwnicy hipotezy higieny wskazują, że w społeczeństwach krajów wysokorozwiniętych jest o wiele więcej zmiennych mogących potencjalnie wpływać na podwyższenie ryzyka alergizacji (zanieczyszczenie powietrza związane z rozwojem przemysłu i boomem motoryzacyjnym, określone nawyki żywieniowe, różny poziom stresu, relatywnie częste stosowanie leków itp.), to doświadczenia na zwierzętach dosyć jednoznacznie wskazują na istotną rolę czynników infekcyjnych [6]. Niedawno przekonująco wykazano prawdziwość hipotezy higieny w badaniach przeprowadzonych w Gabonie w populacji dziecięcej cechującej się wysokim stopniem zapasożycenia układu pokarmowego. W badanej populacji dzieci zostały podzielone na 2 grupy. W jednej otrzymywały leki przeciwbaczące, druga stanowiła kontrolę. Okazało się, że po 30 miesiącach wskaźnik alergizacji, mierzony dodatnim odczynem skórnym na ekstrakt roztoczy kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus*, wzrósł w grupie leczonej dwuipółkrotnie [41].

Powstaje pytanie: w jaki sposób czynniki patogene i ogólnie elementy drobnoustrojów przeprofilowują odpowiedź immunologiczną, aktywując limfocyty Th1 i ułatwiając rozwój limfocytów T regulatorowych, co przeciwdziała wystąpieniu alergii. Wydaje

się, że wynika to ze stymulowania nieswoistych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem receptorów Toll-podobnych (TLR, *Toll-like receptors*).

Receptory Toll-podobne (TLR)

TLR stanowią ważną grupę receptorów, należąca do rodziny receptorów rozpoznających wzorce molekularne drobnoustrojów – PRR (*pattern-recognition receptors*), będących „czujnikami” organizmów wyższych rozpoznającymi elementy mikroorganizmów [43]. Rozpoznają one krytyczne dla przeżycia drobnoustrojów, szeroko rozpowszechnione struktury komórkowe występujące zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz komórki (np. DNA bakteryjny). TLR charakterystyczne są dla komórek układu odpornościowego uczestniczących w nieswoistej obronie, choć ich obecność wykryto także w innych komórkach, na przykład nabłonka jelit i dróg oddechowych oraz w śródbłonku. Niektóre TLR są obecne na powierzchni (np. TLR4), zaś inne w błonie endosomów i fagolizosomów (np. TLR9). Te ostatnie identyfikują elementy drobnoustrojów uwolnione w trakcie trawienia wewnątrzkomórkowego, np. DNA bakterii i wirusów [3, 43]. Aktywacja TLR zachodzi w wyniku dimeryzacji receptora, co powoduje w efekcie uruchomienie szlaków przewodzenia sygnału prowadzących między innymi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, np. NF-κB, i wydzielania określonych cytokin, w tym chemokin i innych mediatorów stanu zapalnego [43]. Efektem jest bezpośredni udział wytwarzanych cytokin, na przykład interferonów, w niespecyficznej obronie bądź kształtowanie określonego typu mechanizmów obrony swoistej Th1- lub Th2-zależnej. Spośród odkrytych do tej pory 13 typów receptorów TLR u człowieka zidentyfikowano 10 (tab. 1), rozpoznających tak różne struktury, jak bakteryjny i wirusowy DNA, białka (np. flagellinę) i związki lipidowe (lipoarabinomannan) [5]. Określonego rodzaju mikroorganizm potrafi aktywować kilka rodzajów TLR, co może dawać efekt addytywny lub nawet synergistyczny, jeśli chodzi o indukcję odpowiedzi immunologicznej [40]. Warto dodać, że oprócz TLR istnieją również inne struktury receptorowe rozpoznające obce elementy, np. receptory NOD-podobne – NLR (*NOD-like receptors*) [23]. Ponieważ w ostatnich latach dosyć dokładnie określono, jakiego rodzaju bakterie (lub ich elementy) indukują za pośrednictwem receptorów TLR profil odpowiedzi immunologicznej Th1-zależnej, jednocześnie hamując odpowiedź z udziałem limfocytów Th2, coraz częściej preparaty bakteryjne i bakteriopochodne stosuje się w próbach profilaktyki lub leczenia alergii [5, 18].

Tabela 1. Receptory Toll-podobne (TLR) rozpoznające wzorce molekularne (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) składników drobnoustrojów zidentyfikowane u człowieka*.

Receptor	Lokalizacja	Rozpoznawany składnik drobnoustroju	Syntetyczny związek – agonista receptora
TLR1*	Błona komórkowa	Triacylowane lipopeptydy i czynniki rozpuszczalne niektórych bakterii (np. <i>Mycobacterium</i>)	
TLR2*	Błona komórkowa	Lipoproteiny i lipopeptydy, peptydoglikan (<i>Staphylococcus aureus</i>), kwas lipoteichojowy, lipoarabinomannan (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>), zymosan (<i>Candida</i>), glikolipidy	
TLR3	Endosomy, fagolizosomy	Dwuniciowy RNA wirusów	Kwas poliinozynocytydylowy (poli I:C)
TLR4	Błona komórkowa	Lipopolisacharydy (bakterie gram-ujemne), białka niektórych wirusów	Monofosforylowany lipid A
TLR5	Błona komórkowa	Flagellina rzęsek bakteryjnych	
TLR6*	Błona komórkowa	Diacylowane lipopeptydy (<i>Mycoplasma</i>)	
TLR7	Endosomy, fagolizosomy	Jednonicowe RNA wirusów bogate w G+U	Imiquimod, resiquimod
TLR8	Endosomy, fagolizosomy	Jednonicowe RNA bogate w G+U	Imiquimod, resiquimod
TLR9	Endosomy, fagolizosomy	Niemetylowane sekwencje CpG w bakteryjnym i wirusowym DNA	1018 ISS, CpG-7909, HYB-2055
TLR10		?	

*Receptory TLR mogą tworzyć heterodimery, np. TLR1/TLR6 i TLR2/TLR6, przez co zwiększa się spektrum rozpoznawanych przez nie związków

Preparaty bakteryjne w leczeniu alergii

1. Prątki z rodzaju *Mycobacterium*

Prątki należą do wolno rosnących, tlenowych bakterii wzrastających w makrofagach i zakażających je. Niektóre są patogenne, np. *M. tuberculosis* i *M. leprae*, inne, np. *M. vaccae*, należą do bakterii saprofitycznych [28]. Chorobotwórcze prątki, a także szczep atenuowany, prątek bydłęcy gruźlicy (BCG) wykorzystywany jako szczepionka u ludzi, indukują odpowiedź immunologiczną typu komórkowego wspomaganą przez limfocyty Th1 [26]. Prątki BCG mają działanie immunostymulujące, adiuwantowe i są wykorzystywane w leczeniu powierzchniowego raka pęcherza moczowego [47]. Wpływ prątków BCG na układ odpornościowy wynika z interakcji ich składników z receptorami *Toll-like*: TLR1, TLR2, a także TLR9. Ten ostatni identyfikuje niemetylowane sekwencje CpG w bakteryjnym i wirusowym DNA. Ponieważ stymulowanie odpowiedzi immunologicznej o profilu Th1 wiąże się jednocześnie z hamowaniem odpowiedzi Th2-zależnej, promującej zjawiska nadwrażliwości typu I, istnieją przesłanki do stosowania BCG w profilaktyce lub leczeniu alergii u ludzi. Poparte są one pozytywnymi wynikami doświadczeń na zwierzętach i dodatkowo obserwacjami rzadszego chorowania na alergię przez dzieci z dodatkowymi odczynami w próbach tuberkulinowych [32].

Preparat BCG był testowany w kilku ośrodkach klinicznych w Chinach w leczeniu alergii przez ostatnie dwie dekady zeszłego wieku. Badania ujawniły pewien

pozytywny efekt [20, wg 33]. Korzystne okazało się również podanie podskórne BCG w leczeniu astmy u dorosłych w badaniach Choi i Koh [5]. Wyników tych nie potwierdziło niedawno opublikowane doniesienie, w którym BCG zastosowano jako dodatek do immunoterapii alergenem w leczeniu dzieci z łagodną lub umiarkowaną astmą, uczulonych na roztocza kurzu domowego. Zastosowanie łączne BCG i immunoterapii alergenem nie okazało się korzystniejsze niż sama immunoterapia [7].

Kilka badań dotyczyło prątków saprofitycznych *Mycobacterium vaccae*. W jednym z nich (randomizowane, z podwójną ślepą próbą) ograniczonej liczbie pacjentów z umiarkowaną astmą i dodatkowymi wynikami testów skórnych z roztoczymi kurzu domowego podawano śródskórnie zabite, autoklawowane lub odpowiednio preparowane prątki *M. vaccae*. Nie uzyskano efektu terapeutycznego ani zmiany parametrów immunologicznych u leczonych pacjentów w porównaniu z kontrolą [33]. Preparat zabitych termicznie prątków *M. vaccae* testowano również w leczeniu kataru siennego – uzyskano pozytywny efekt terapeutyczny [14].

Prątki *M. vaccae* zabite termicznie stosowane były również w celu złagodzenia objawów u dzieci z atopowym zapaleniem skóry. W badaniu tym (randomizowane, z podwójną ślepą próbą) uzyskano zmniejszenie powierzchni pól skóry objętych zapaleniem i obniżenie wskaźnika ciężkości zapalenia u dzieci poddanych terapii *M. vaccae* [1].

Jak widać z powyższych przykładów, bakterie z rodzaju *Mycobacterium* cechuje pewien (słaby) potencjał „antyalegiczny” [28]. W związku z identyfikacją silnego, immunologicznie czynnego składnika tych bakterii, jakim są niemetylowane sekwencje CpG w DNA, udało się stworzyć syntetyczne oligodeoksynukleotydy (ODN) imitujące działanie bakteryjnych DNA. Umożliwiają one kontynuowanie – w nowocześniejszej formie – prób terapeutycznych wykorzystania bakterii do leczenia chorób nie tylko alergicznych, ale także w profilaktyce bądź leczeniu chorób nowotworowych i zakaźnych [13, 19, 37]. Preparaty te opisano w dalszym rozdziale.

2. Probiotyki

Probiotykami nazywa się żywe mikroorganizmy (przede wszystkim bakterie), które mogą wywierać korzystny wpływ na człowieka po ich podaniu doustnym. Wykazano, że podawanie *per os* preparatów zawierających probiotyki (zwłaszcza szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG) działa korzystnie w zapobieganiu powstawania i leczeniu biegunek infekcyjnych (zwłaszcza o etiologii wirusowej) u dzieci [36]. Stwierdzono, że probiotyki lub produkty je zawierające stymulują wytwarzanie IFN- γ i IL-12 przez leukocyty krwi oraz nasilają właściwości żerne makrofagów [12, 22, 30].

Lokalnie w jelicie grubym probiotyki ograniczają stany zapalne, między innymi poprzez stymulację wytwarzania przez enterocyty TGF- β i PGE₂, promowanie rozwoju limfocytów regulatorowych (Treg) i tolerogennych komórek dendrytycznych [25].

W badaniach skandynawskich wykazano, że podawanie (w diecie) kobietom w ciąży i dzieciom po urodzeniu probiotyków (*Lactobacillus* GG) redukowało występowanie atopowych zmian skórnych. Suplementacja probiotykami nie wpływała jednak na częstość występowania alergii wziewnych [17]. Obecnie w kilku ośrodkach na świecie prowadzone są badania nad zastosowaniem probiotyków w prewencji alergii u dzieci (głównie alergii skórnych). Do czasu zakończenia badań w związku ze sprzecznymi wynikami prób klinicznych [2] nie ma podstaw by sądzić, że ta forma profilaktyki w istotny sposób ograniczy zapadalność na alergię wziewną [25].

Składniki drobnoustrojów w leczeniu alergii

1. Oligodeoksynukleotydy zawierające niemetylowane sekwencje CpG

Jedną z podstawowych różnic między budową DNA drobnoustrojów i organizmów wyższych, w tym ssaków, jest częstsze u tych pierwszych występowanie par nukleotydów cytydyny i guanidyny (CpG).

W parach tych cytozyna jest w przeciwieństwie do DNA organizmów wyższych z reguły niemetylowana. Obecność niemetylowanych motywów CpG powoduje, że organizmy ssaków (w tym człowieka) identyfikują i lokalizują zakażenie dzięki obecności na limfocytach B i komórkach dendrytycznych odpowiednich receptorów rozpoznających wzorce molekularne drobnoustrojów. Są to receptory TLR9 [4, 26]. W wyniku rozpoznania obcego DNA w organizmie człowieka mobilizowane są szybko mechanizmy obrony, początkowo nieswoistej (związane z wydzielaniem dużej ilości IFN- α), a później swoistej antygenowo. Tak więc DNA zawierające niemetylowane motywy CpG ma właściwości adiuwantowe. Odkryli je ponad 20 lat temu Tokunaga i wsp. [39, 46], którzy wykazali, że DNA wyekstrahowane z BCG ma właściwości immunostymulujące, zaś w wyniku trawienia DNAzą dochodzi do ich utraty.

Wiedząc, że krytyczne dla immunostymulującego efektu są pary CpG z niemetylowaną cytozyną, stworzono wiele syntetycznych oligodeoksynukleotydów (ODN) o różnym potencjale immunostymulacyjnym. Preparaty te określa się jako ISS-ODN (*immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotides*) lub rzadziej CpG-ODN (*cytosine-phosphate-guanine-containing oligodeoxynucleotides*). W celach terapeutycznych mają zamiast tlenu dołączoną resztę siarczkową do fosforu w reszcie fosforanowej (ODN, *phosphorothioate*), dzięki czemu stają się odporne na degradację przez DNAzę, przez co zwiększa się ich okres półtrwania.

W zależności od budowy i oddziaływania na komórki człowieka ISS-ODN dzielone są na 3 podstawowe grupy: A, B i C (CpG-A, CpG-B i CpG-C). CpG-A stymulują silnie wydzielanie IFN- α przez plazmacytoidalne komórki dendrytyczne. Natomiast CpG-B umożliwiają dojrzewanie plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych i aktywują limfocyty B: indukują w tych komórkach ekspresję cząsteczek CD40, CD69, CD80 i MHC klasy II, stymulują wydzielanie IL-6 i IL-10 oraz proliferację. CpG-C łączą cechy obu poprzednich typów [13].

ISS-ODN były i są testowane jako adiuwanty szczepionek u człowieka (np. przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B) [19], w onkologii (np. w próbach leczenia chłoniaków nieziarniczych) [11, 19] i w leczeniu chorób alergicznych [19]. Podane w połączeniu z alergenem z jednej strony indukują odpowiedź swoistą w stosunku do alergenu, z drugiej strony przeprofilują tę odpowiedź w kierunku Th1. Okazało się, że podawanie koniugowanych alergenów z ISS-ODN (koniugaty te określane są jako AIC – *alergen/ISS-ODN conjugates*) działa korzystnie niż

użycie tych preparatów oddzielnie [38]. Koniugaty cechuje większa zdolność immunizacji przy zmniejszonych właściwościach alergizacji (ich wpływ na degranulację komórek tucznych jest słabszy).

W alergologii najintensywniej testowano preparat AIC zawierający immunostymulator ODN 1018 połączony z alergenem chwastu ambrozji *Amb a 1* [8, 34]. Badaniami objęto pacjentów z sezonowym alergicznym nieżytem nosa z potwierdzonym uczuleniem na alergeny ambrozji. Wykazano, że u tych osób podawanie szczepionki AIC przeprofilowało odpowiedź na alergen w kierunku Th1. Objawiało się to podwyższoną zdolnością wytwarzania IFN- γ przez limfocyty w wyniku swoistej stymulacji ekstraktem ambrozji, co badano kilka miesięcy po szczepieniu [34]. W bardzo rzetelnie przeprowadzonym badaniu randomizowanym, z podwójnie ślełą próbą, którego wyniki opublikowano niedawno w „New England Journal of Medicine”, podawanie sześciu wzrastających dawek szczepionki AIC w tygodniowych odstępach okazało się skuteczne w łagodzeniu objawów alergicznego nieżyty nosa. U pacjentów poddanych szczepieniu objawy alergii były łagodniejsze w pierwszym sezonie po szczepieniu, i co istotne efekt ten obserwowano także w następnym sezonie pylenia. Wskaźniki alergizacji pacjentów, np. odpowiedź w testach skórnych na alergen, również były obniżone u pacjentów leczonych szczepionką [8].

Aktualnie preparat szczepionki AIC pod nazwą TOLAMBA™ (Dynavax) testowany jest w fazie III badań klinicznych na pacjentach z alergicznym sezonowym nieżytem nosa uczulonych na ambrozię [48]. Firma sponsorująca badania spodziewa się pozytywnych wyników i rejestracji preparatu w 2009 roku.

2. Lipopolisacharydy (LPS)

Lipopolisacharydy (endotoksyny) są związkami typowymi dla bakterii gram-ujemnych (np. pałeczek *E. coli* czy *Salmonella*). Choć LPS w hodowlach mysich limfocytów B wzmagał wytwarzanie IgE, to z obserwacji *in vivo* wynika, że zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u człowieka narażenie na LPS generalnie zmniejsza ryzyko nabycia alergii. Trzeba jednak podkreślić, że to korzystne działanie ograniczone jest do wysokich dawek LPS [26]. Wynika z interakcji LPS z receptorem TLR4 i z zaangażowania w szlakach przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego białka adaptorowego MyD88 [15, 16]. LPS działa przeciwalergicznie wówczas, gdy kontakt z tym związkiem zachodzi przed fazą uczulenia. Na prewencyjne działanie LPS wskazują badania ujawniające zmniejszoną zapadalność na alergię u dzieci wzrastających w warunkach

częstego kontaktu ze zwierzętami gospodarczymi w środowiskach wiejskich [27].

W klinice LPS mimo działania immunomodulującego (stymuluje masywny wyrzut cytokin) nie jest stosowany terapeutycznie z powodu wysokiej toksyczności. Może ponadto nasilać objawy u osób uczulonych. Natomiast w alergologii badana jest cząsteczka pochodna LPS (z LPS *Salmonella minnesota* R595) o ograniczonej toksyczności i podobnym działaniu adiuwantowym: monofosforylowany lipid A (MPL®) [9]. MPL® stymuluje wydzielanie przez komórki żerne IL-10, która hamuje procesy zapalne. Jednocześnie, jednak w znacznie mniejszych dawkach niż LPS, promuje wytwarzanie typowych cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , interferony i IL-6 [22, 29]. Profiluje odpowiedź immunologiczną w kierunku Th1 [22, 44]. MPL® jest składnikiem niedawno zarejestrowanych przez GlaxoSmithKline szczepionek: Cervarix® (przeciwno wirusom brodawczaka człowieka wywołującym raka szyjki macicy) i Fendrix® (przeciwno wirusowemu zapaleniu wątroby typu B).

Podsumowanie

Badania wykorzystujące mikroorganizmy bądź elementy drobnoustrojów w leczeniu schorzeń alergicznych, głównie astmy, wskazują na umiarkowanie korzystny efekt działania preparatów je zawierających. Problem użyteczności czynników infekcyjnych w alergologii należy rozważać w dwóch aspektach: 1. profilaktyki i 2. terapii. Wydaje się, że w celu zapobieżenia alergizacji (dotyczyłoby to głównie dzieci) korzystne byłoby stosowanie nieswoistych „szczepionek” zdolnych do profilowania w szerokim zakresie odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1. W przypadku osób już cierpiących na alergię istotniejsza byłaby terapia celowana – bazująca na koniugatach alergenów z odpowiednimi adiuwantami, każdorazowo prowadzona w połączeniu ze standardowym leczeniem farmakologicznym.

Piśmiennictwo:

1. Arkwright P.D., David T.J.: Intra-dermal administration of a killed *Mycobacterium vaccae* suspension (SRL 172) is associated with improvement in atopic dermatitis in children with moderate-to-severe disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 107: 531-534.

2. Adlerberth I, Strachan D.P., Matricardi P.M. et al.: Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 120: 343-350.
3. Bauer S., Hangel D., Yu P.: Immunobiology of toll-like receptors in allergic diseases. *Immunobiology* 2007, 212: 521-533.
4. Chalubiński M., Kowalski M.L.: Fragmenty bakteryjnego DNA o właściwościach immunomodulacyjnych (CpG) – związek z chorobami alergicznymi. *Alergia Astma Immunologia* 2003, 8: 1-7.
5. Choi I.S., Koh Y.I.: Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: a randomized, controlled trial. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002, 88: 584-591.
6. Chu H.W., Honour J.M., Rawlinson C.A. et al.: Effects of respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection on allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and lung inflammation in mice. *Infect. Immun.* 2003, 71: 1520-1526.
7. Cohon A., Arruda L.K., Martins M.A. et al.: Evaluation of BCG administration as an adjuvant to specific immunotherapy in asthmatic children with mite allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 120: 210-213.
8. Creticos P.S., Shroeder J.T., Hamilton R.G. et al.: Immunotherapy with a ragweed-Toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355: 1445-1455.
9. Drachenberg K.J., Wheeler A.W., Stuebner P et al.: A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy* 2001, 56: 498-505.
10. Flohr C., Tuyen L.N., Lewis S. et al.: Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: a cross-sectional study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 118: 1305-1311.
11. Friedberg J.W., Kim H., McCauley M. et al.: Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon- α/β -inducible gene expression, without significant toxicity. *Blood* 2005, 105: 489-495.
12. Hessle C., Hanson L.A., Wold A.E.: Lactobacilli colonizing the human gastro-intestinal tract are potent inducers of IL-12. *Clin. Exp. Immunol.* 1999, 116: 276-282.
13. Higgins D., Marshall J.D., Traquina P. et al.: Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* 2007, 6: 747-759.
14. Hopkin J.M., Shaldon S., Ferry B., et al.: Mycobacterial immunisation in grass pollen asthma and rhinitis. *Thorax* 1998, 53 (supl. 4): S63.
15. Horner A.A.: Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117: 1133-1140.
16. Kaisho T., Hoshino K., Iwabe T. et al.: Endotoxin can induce MyD88-deficient cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int. Immunol.* 2002, 14: 695-700.
17. Kalliomaki M., Salminen S., Poussa T. et al.: Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003, 361: 1869-1871.
18. Kanzler H., Barrat F.J., Hessel E.M., Coffman R.L.: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Med.* 2007, 5: 552-559.
19. Krieg A.M.: Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Rev. Drug Discovery* 2006, 5: 471-484.
20. Loubei Z., Dihua S., Jiening W.: Prophylactic effect of BCG vaccination on the recurrence of children asthma. *Chin. J. Paediat.* 1991, 39: 165-167.
21. Matricardi P.M., Rosmini F., Ferrigno L. et al.: Cross-sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *Brit. Med. J.* 1997, 314: 999-1003.
22. Matricardi P.M., Bjorksten B., Bonini S. et al.: Microbial products in allergy prevention and therapy. *Allergy* 2003, 58: 461-471.
23. Medzhitov R.: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007, 449: 819-826.
24. Obihara C.C., Beyers N., Gie R.P.: Inverse association between *Mycobacterium tuberculosis* infection and atopic rhinitis in children. *Allergy* 2005, 60: 1121-1125.
25. Prescott S.L., Bjorksten B.: Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 120: 255-262.
26. Racila D.M., Kline J.N.: Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 116: 1202-1205.
27. Riedler J., Braun-Fahrlander C., Eder W. et al.: Early life exposure to farming environment is essential for protection against the development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001, 358: 1129-1133.
28. Rook G.A.W., Hamelmann E., Brunet L.R.: Mycobacteria and allergies. *Immunobiology* 2007, 212: 461-473.
29. Salkowski C.A., Detore G.R., Vogel S.N.: Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. *Infect. Immun.* 1997, 65: 3239-3247.
30. Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H. et al.: Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 1995, 78: 491-497.
31. Shaheen S.O., Aaby P., Hall A.J. et al.: Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996, 347: 1792-1796.
32. Shirakawa T., Enomoto T., Shimazu S.: The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997, 275: 77-79.
33. Shirtcliffe P.M., Easthope S.E., Cheng S. et al.: The effect of delipidated (DDMV) and heat-killed *Mycobacterium vaccae* in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001, 163: 1410-1414.

34. Simons F.E.R., Shikishima Y., van Nest G. et al.: Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting *Amb a 1* linked to immunostimulatory DNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 113: 1144-1151.
35. Strachan D.P.: Hay fever, hygiene, and household size. *Brit. Med. J.* 1989, 299: 1259-1260.
36. Szajewska H., Mrukowicz J.: Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized double-blind placebo-controlled trials. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2001, 33: S17-S25.
37. Świtaj T., Jalili A., Jakubowska A.B. et al.: CpG immunostimulatory oligodeoxynucleotide (ODN) 1826 enhances antitumor effect of IL-12 gene-modified tumor vaccine in a melanoma model in mice. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10: 4165-4175.
38. Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D. et al.: Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen *Amb a 1* enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 106: 124-134.
39. Tokunaga T., Yamamoto H., Shimada S. et al.: Antitumor activity of deoxynucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984, 72: 955-962.
40. Trinchieri G., Sher A.: Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Rev. Immunol.* 2007, 7: 179-190.
41. van den Biggelaar A.H.J., Rodrigues L.C., van Ree R. et al.: Long-term treatment of intestinal helminthes increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J. Infect. Dis.* 2004, 189: 892-900.
42. Vercelli D.: Mechanisms of the hygiene hypothesis – molecular and otherwise. *Curr. Opin. Immunol.* 2006, 18: 733-737.
43. West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S.: Recognition and signaling by Toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2006, 22: 409-437.
44. Wheeler A.W., Marshall J.S., Ulrich J.T.: A Th1-inducing adjuvant, MPL[®], enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001, 126: 135-139.
45. Wickens K., Pearce N., Crane J., Beasley R.: Antibiotic use in early childhood and the development of asthma. *Clin. Exp. Allergy* 1999, 29: 766-771.
46. Yamamoto S., Kuramoto E., Shimada S. et al.: In vitro augmentation of natura killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn. J. Cancer Res.* 1988, 79: 866-873.
47. Zapala Ł., Lasek W.: Naturalne immunostymulatory egzogenne. *Post. Biol. Kom.* 2007, 34: 581-594.
48. [online: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00537355> (10 marca 2008)].

Adres autora:

prof. dr hab. n. med. Witold Lasek
 Zakład Immunologii Centrum Biostruktury
 Warszawski Uniwersytet Medyczny
 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a (blok „F”)
 e-mail: wlasek@ib.amwaw.edu.pl