

Syntetyczne oligodeoksynukleotydy zawierające niemetylowane dinukleotydy cytozyno-guaninowe jako immunostymulatory u drobiu

PAULINA SZCZUBEŁEK, PIOTR SZELESZCZUK

Zakład Chorób Ptaków Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Szczubełek P., Szeleszczuk P.

Synthetic oligodeoxynucleotides consisting of unmethylated cytosine-guanosine dinucleotides as immunostimulators for poultry

Summary

Fragments of bacterial and viral DNA are identified by the immune system of vertebrates which cause the activation of specific and non-specific mechanisms of immunological response. Similar immunostimulating effects can be achieved by using oligodeoxynucleotides (ODN) consisting of unmethylated cytosine-guanosine dinucleotides (CpG ODN). Numerous studies show the capability of their appliance in treating bacterial, viral and parasitic infections, as well as in the therapy of tumors and cancers and in specific immunoprophylactics of many kinds of animal (including bird) diseases. This fact creates the capability of using CpG ODN in large scale poultry production. The authors describe the influence of CpG ODN on immune system cells and the possibilities of the practical application of CpG ODN in therapy and immunoprophylaxis of poultry diseases.

Keywords: CpG ODN, immunostimulatory activity, poultry, Toll-like receptors

Początkowym etapem rozwoju nieswoistej reakcji obronnej organizmu jest rozpoznanie obecności drobnoustroju. Proces ten odbywa się poprzez identyfikację molekularnych wzorców patogenności (Patogen Associated Molecular Patterns – PAMP). Jedną z części PAMP są fragmenty bakteryjnego i wirusowego DNA zawierające niemetylowane, dinukleotydowe sekwencje cytozyno-guaninowe (Cytosine-phosphate-Guanosine – CpG). Podobnie na mechanizmy odpornościowe oddziałują ich syntetyczne odpowiedniki oligodeoksynukleotydy zawierające motyw CpG, (Oligodeoxynucleotides containing the CpG motif – CpG ODN). Receptorami dla części PAMP są receptory rozpoznające wzorzec (Pattern Recognition Receptors – PRR), wśród których wyróżniamy receptory Toll-podobne (Toll-like receptors – TLR).

Do dnia dzisiejszego u ssaków opisano kilkanaście receptorów toll-podobnych (dwanaście u myszy, dziesięć u ludzi) (15). Natomiast u ptaków stwierdzono obecność: TLR 1LA, TLR 1LB, TLR 2A, TLR 2B, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 15 i TLR 21 (28).

Immunostymulujące działanie bakteryjnego DNA zostało po raz pierwszy opisane przez Tokunagę i wsp. ponad 20 lat temu (29). W późniejszych badaniach doniesienia te potwierdzono, wykazując także, że

DNA kręgowców nie posiada takich właściwości (16). Wkrótce też efekt ten przypisano określonym palindromowym sekwencjom, zawierającym niemetylowane dinukleotydy cytozyno-guaninowe, umieszczone w tzw. „szczególnym kontekście zasad” (zazwyczaj w sąsiedztwie dwóch zasad purynowych od końca 5' i dwóch pirymidynowych od końca 3') (16, 25). Stwierdzono, że DNA kręgowców wykazuje znacząco niższą zawartość takich motywów, ponadto cytozyna zazwyczaj występuje w nich w postaci połączonej z grupą metylową (16, 25), co, jak wykazano doświadczalnie, znosi immunostymulujące działanie takich sekwencji (16).

Sekwencje wykazujące najsilniejsze działanie immunostymulujące są różne dla poszczególnych gatunków zwierząt. Aktywacja komórek układu odpornościowego człowieka zachodzi najmocniej pod wpływem sekwencji GTCGTT (ODN-2006), a w odniesieniu do komórek myszy jest to GACGTT (ODN-1826) (25). Przeprowadzone do dnia dzisiejszego badania nie pozwalają na jednoznaczne wytypowanie takich sekwencji dla poszczególnych gatunków ptaków.

Mechanizm molekularnego oddziaływania CpG DNA na komórki układu odpornościowego nie jest w pełni poznany. Spośród kilkunastu opisanych u ssa-

ków receptorów toll-podobnych za identyfikację motywów CpG odpowiada TLR9 (13, 31). Jak dotychczas u ptaków nie zidentyfikowano receptora TLR9 (28). Jednak liczne badania (7, 12, 15) wykazujące oddziaływanie syntetycznych oligodeoksynukleotydów zawierających motywy CpG na układ odpornościowy ptaków pozwalają przypuszczać, iż odkrycie TLR9 u przedstawicieli tej gromady jest kwestią czasu lub w proces identyfikacji CpG zaangażowany jest inny, występujący u ptaków receptor. Analiza budowy oraz położenia obszarów bogatych w leucynę (Leucine Reach Regions – LRR) receptorów wykazała, iż funkcjonalnym odpowiednikiem TLR9 ssaków może być kurzy TLR7 – chTLR7 (Chicken TLR7) (37). Według innych autorów, motywy CpG mogą być rozpoznawane poprzez receptory chTLR15 (Chicken TLR15) lub chTLR21 (Chicken TLR21) (15).

Efekt oddziaływania CpG ODN na komórki układu odpornościowego został dobrze poznany w przypadku komórek układu odpornościowego ssaków, zwłaszcza ludzi i myszy. Znacznie mniej wiadomo na ten temat w odniesieniu do ptaków. Oligodeoksynukleotydy zawierające motywy CpG prowadzą do aktywacji zarówno nieswoistych, jak i swoistych mechanizmów odporności organizmu. Motywy CpG oddziałują (bezpośrednio lub za pośrednictwem wydzielanych przez inne komórki cytokin) na wiele różnych komórek układu odpornościowego, w tym na komórki dendrytyczne (Dendritic Cells – DC), makrofagi, monocyty, komórki NK, neutrofile, limfocyty B oraz limfocyty T (16, 22, 25, 31).

Motywy CpG stymulują dojrzewanie i aktywują komórki dendrytyczne (16, 25). Pod wpływem ODN-CpG dochodzi do wzrostu ekspresji cząsteczek MHC klasy II oraz cząsteczek kostymulujących, tj.: CD40, CD86, CD54 (10, 16, 25) na powierzchni komórek dendrytycznych, co przygotowuje je do prezentacji antygenów limfocytom T. Oddziaływanie CpG ODN na komórki dendrytyczne znacząco zwiększa produkcję IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 oraz TNF- α (19, 25, 27).

Wykazano, iż stymulacja makrofagów CpG ODN prowadzi do wzrostu produkcji i uwalniania IL-12 oraz TNF- α (16, 25, 26), jednak w odróżnieniu od komórek DC nie reagują one wzrostem ekspresji cząsteczek powierzchniowych biorących udział w procesie prezentacji antygenów. Wykazano nawet spadek ekspresji cząsteczek MHC klasy II na powierzchni makrofagów pod wpływem CpG ODN (2). Badania przeprowadzone z użyciem transformowanej linii makrofagów kurzych HD11 wykazały wzrost sekrecji IL-6, tlenku azotu (NO) oraz zdolności fagocytozy i wewnątrzkomórkowego zabijania *Salmonella enteritidis* pod wpływem działania CpG ODN (35). Jednak w badaniach tych wykazano także efekt hamujący proliferację oraz indukujący apoptozę komórek linii HD11 (35). Znacząco wyższy efekt stymulujący w odniesieniu do tych komórek uzyskano stosując ODN 2006 w porównaniu z ODN 1826 (35).

Stymulujący efekt CpG ODN w odniesieniu do ludzkich monocytów przejawia się wzrostem sekrecji IL-12, IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- α oraz IFN- β , a także wzrostem ekspresji cząsteczki adhezji międzykomórkowej-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1 – ICAM-1) (25, 26).

Aktywacja komórek NK pod wpływem CpG ODN ma charakter pośredni i zachodzi pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki APC (IL-12, IFN- $\alpha\beta$, TNF- α) (1, 9). Aktywacja komórek NK prowadzi do wzrostu sekrecji IFN- γ oraz stymulacji zarówno „naturalnej” aktywności litycznej komórek NK, jak i mechanizmu cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity – ADCC) (1, 9, 16). Wydzielany przez komórki NK interferon- γ , obok IL-12, ma decydujące znaczenie dla rozwoju procesów odpornościowych typu Th-1 (14, 31).

Aktywacja limfocytów B pod wpływem CpG ODN prowadzi do hamowania procesu spontanicznej apoptozy i wzrostu przeżywalności tych komórek (31, 36), zwiększa ekspresję genów kodujących cząsteczki MHC klasy II i cząsteczki kostymulujące, tj.: B7.1, B7.2, stymuluje wydzielanie cytokin (IL-6, IL-10) (25) oraz znacząco wpływa na poziom i rodzaj wytwarzanych przeciwciał (30, 31).

Oddziaływanie CpG ODN na limfocyty T ma prawdopodobnie charakter pośredni i odbywa się za pośrednictwem cytokin wytwarzanych przez inne komórki (25, 31). Niektórzy autorzy nie wykluczają również bezpośredniego oddziaływania motywów CpG na limfocyty T za pośrednictwem fragmentów Poli-G (19). Wytwarzana przez np. komórki dendrytyczne IL-12 odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu prekursorowych komórek Th0 w komórki Th1 podczas procesu prezentacji antygenów. Istotne znaczenie dla rozwoju procesów typu Th1 ma również IFN- γ wytwarzany przez komórki NK i Th1 (22, 23, 25, 31).

Ze względu na mechanizm oddziaływania CpG ODN na komórki układu odpornościowego i stymulację odpowiedzi immunologicznej typu Th-1 szczególnie istotne wydaje się zastosowanie tego immunostymulatora w odniesieniu do patogenów wewnątrzkomórkowych. Dotychczasowe badania obrazują immunoprotekcyjne oddziaływanie CpG ODN w przebiegu zakażeń bakteryjnych i pierwotniaczych u drobiu, a także możliwości zastosowania tego modulatora jako adiuwantu szczepionkowego.

He i wsp. (11, 12) wykazali, iż zastosowanie CpG ODN u jednodniowych piskląt znacząco zmniejsza śmiertelność oraz stopień kolonizacji narządów wewnętrznych ptaków eksperymentalnie zakażonych pałeczkami *Salmonella*. W badaniach *in vitro* i *in vivo* cytowani autorzy wykazali stymulujący wpływ na wybuch tlenowy, generowanie reaktywnych form tlenu oraz na stopień degranulacji heterofili kurzych (11, 12), których aktywność ma istotne znaczenie dla rozwoju uogólnionej salmonellozy drobiu (5). Podobny

wpływ CpG ODN na aktywność heterofili oraz kolonizację jelit przez *S. enteritidis* u kilkudniowych kurcząt uzyskano podając immunostymulator do płynu owodniowego zarodków kurzych (20).

Równie korzystny efekt protekcyjny uzyskano stosując CpG ODN w przypadku kolibakteriozy i *cellulitis* u brojlerów kurzych (8). W grupie ptaków otrzymujących CpG ODN wykazano znaczący wzrost przeżywalności, mniejszy odsetek ptaków z posocznicą oraz słabiej wyrażone zmiany anatomopatologiczne i histopatologiczne w przebiegu *cellulitis* (8). Natomiast w badaniu mikrobiologicznym materiału pobranego z worków powietrznych oraz z tkanki podskórnej wykazano znacząco mniejszy wzrost *E. coli* (8). W późniejszych badaniach stwierdzono także, iż CpG ODN podawane *in ovo* w 18. lub 19. dniu inkubacji zarodków może wywierać efekt ochronny przed rozwojem posocznicy u piskląt eksperymentalnie zakażonych zjadliwymi szczepami *E. coli* (O2, K1) (7). Gomis i wsp. (6) zbadali także efekt immunizacji kurcząt szczepionką zawierającą inaktywowany szczep pałeczki okrężnicy z CpG ODN jako adiuwantem w porównaniu do analogicznej szczepionki zawierającej adiuwant w postaci emulsji wodno-olejowej. Po eksperymentalnym zakażeniu ptaków zjadliwymi, homologicznymi szczepami *E. coli* przeżywalność w grupie, w której zastosowano szczepionkę z CpG ODN, wynosiła 92% (podczas gdy w grupie, której podano preparat zawierający emulsję wodno-olejową tylko 65%). Podobnie, ocena odpowiedzi serologicznej, a także badanie mikrobiologiczne narządów wewnętrznych badanych ptaków potwierdziły korzystny efekt zastosowania CpG ODN podczas immunizacji kurcząt (6).

Wyniki badań z zastosowaniem CpG ODN w przebiegu kokcydiozy kur nie są już tak jednoznacznie pozytywne. Wykazano wprawdzie redukcję liczby oocyt w kale, jednak efekt ten zależny był od linii genetycznej i wieku ptaków oraz dawki i postaci chemicznej oligodeoksynukleotydu (4). Spadek liczby wydalanych oocyst u ptaków doświadczalnie zakażonych *E. acervulina* uzyskano także podając CpG ODN do jamy owodniowej zarodków (3). Podobnie, podanie tą drogą szczepionki zawierającej rekombinowane białko mikronem (MIC2) i CpG ODN skutkowało redukcją liczby oocyst w kale oraz zwiększeniem przyrostów masy ciała ptaków (3).

W przeprowadzonych badaniach wykazano również korzystny efekt zastosowania CpG ODN w immunoprofilaktyce chorób wirusowych drobiu: zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza (Infectious Bursal Disease – IBD), rzekomego pomoru drobiu (Newcastle disease – ND) oraz grypy ptaków (Avian influenza – AI).

W 2003 r. Wang i wsp. (32) zbadali możliwość zastosowania szczepionki zawierającej wbudowane do plazmidowego DNA geny białka wirusowego – VP2 (Viral Protein 2) wysoce zjadliwych (vvIBD – very

virulent IBD) szczepów wirusa IBD w połączeniu z CpG ODN jako adiuwantem. Ptaki immunizowano dwukrotnie w 7. i 14. dniu życia, a następnie inokulowano vvIBD (izolat 99J1). U badanych ptaków stwierdzono niższą śmiertelność i częstotliwość występowania objawów klinicznych oraz mniejsze natężenie zmian anatomopatologicznych i histopatologicznych w odniesieniu do grupy otrzymującej szczepionkę bez CpG ODN. W badaniu serologicznym wykazano także istotnie wyższe miana przeciwciał po immunizacji szczepionką z adiuwantem CpG ODN (32). Podobny efekt uzyskano porównując efekt immunizacji kurcząt rekombinowanym plazmidem pRc-VP2 i CpG ODN z grupą otrzymującą szczepionkę bez adiuwantu oraz z ptakami otrzymującymi komercyjne szczepionki przeciwko IBD (21). Jednak w podobnym doświadczeniu Roh i wsp. (24) badając efekt trzech różnych adiuwantów stosowanych ze szczepionką DNA zawierającą plazmid z wbudowanymi genami VP2, VP3, VP4 wysoce zjadliwego szczepu IBV (izolat SH/92), uzyskali zupełnie odmienne wyniki. Doświadczenie to nie wykazało żadnej statystycznie istotnej różnicy w poziomie przeciwciał oraz indeksie stymulacji limfocytów u kurcząt, u których zastosowano CpG ODN. Wykazano natomiast większą śmiertelność oraz niższy indeks masy bursy Fabrycjusza u ptaków, którym podano szczepionkę z adiuwantem ODN w porównaniu do grupy szczepionej samą DNA szczepionką. Autorzy sugerują jednak możliwość wystąpienia zależnej od dawki ODN redukcji ekspresji plazmidowych genów; zjawisko takie zostało wcześniej opisane u myszy (34).

Skuteczność CpG jako adiuwantu szczepionkowego potwierdzono także w przypadku szczepień przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu. Wszystkie badane parametry (nasilenie objawów klinicznych, odsetek śmiertelności, poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko NDV, indeks stymulacji limfocytów w teście transformacji blastycznej) potwierdziły korzystny efekt zastosowania CpG jako adiuwantu (17). W ostatnim czasie wykazano też możliwość stymulacji mechanizmów odporności lokalnej błon śluzowych po immunizacji kurcząt przeciwko ND szczepionką z CpG ODN podaną donosowo (38).

Podjęto również próby wykorzystania CpG ODN w walce z wysoce zjadliwą grypą ptaków (Highly pathogenic avian influenza – HPAI). Zastosowano szczepionkę z inaktywowanym szczepem H5N1 oraz fragmenty bakteryjnego DNA lub CpG ODN jako adiuwantem. Uzyskano interesujące wyniki: zastosowanie olejowej szczepionki z wcześniej inkorporowanym do niej adiuwantem skutkowało silniejszym pobudzeniem mechanizmów odpornościowych, natomiast osobne zastosowanie szczepionki i adiuwantu nie wywierało takiego efektu (33).

Mimo iż dane piśmiennictwa potwierdzają immunostymulujące działanie syntetycznych oligodeoksynukleotydów zawierających niemetylowane dinukleo-

tydy cytozyno-guaninowe u drobiu, niezbędne są dalsze badania w celu opracowania praktycznych możliwości zastosowania CpG ODN w praktyce drobiarskiej.

Piśmiennictwo

1. Chace J. H., Hooker N. A., Mildenstein K. L., Krieg A. M., Cowdery J. S.: Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1997, 84, 185-193.
2. Chu R. S., Askew D., Noss E. H., Tobian A., Krieg A. M., Harding C. V.: CpG oligodeoxynucleotides down-regulate macrophage class II antigen processing. *J. Immunol.* 1999, 163, 1188-1194.
3. Dalloul R. A., Lillehoj H. S., Klinman D. M., Ding X., Min W., Heckert R. A., Lillehoj E. P.: In ovo administration of CpG oligonucleotides and the recombinant microneme protein MIC2 protects against *Eimeria* infections. *Vaccine* 2005, 23, 3108-3113.
4. Dalloul R. A., Lillehoj H. S., Okamura M., Xie H., Min W., Ding X., Heckert R. A.: In vivo effects of CpG oligodeoxynucleotide on *Eimeria* infection in chickens. *Avian Dis.* 2004, 48, 83-90.
5. Genovese L. L., Lowry V. K., Genovese K. J., Kogut M. H.: Longevity of augmented phagocytic activity of heterophils in neonatal chickens following administration of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines to chickens. *Avian Pathol.* 2000, 29, 117-122.
6. Gomis S., Babiuk L., Allan B., Willson P., Edwin W., Hecker R., Potter A.: Protection of chickens against a lethal challenge of *Escherichia coli* by a vaccine containing CpG Oligodeoxynucleotides as an adjuvant. *Avian Dis.* 2006, 51, 78-83.
7. Gomis S., Babiuk L., Allan B., Willson P., Waters E., Ambrose N., Hecker R., Potter A.: Protection of neonatal chicks against a lethal challenge of *Escherichia coli* using DNA containing cytosine-phosphodiester-guanine motifs. *Avian Dis.* 2004, 48, 813-822.
8. Gomis S., Babiuk L., Godson D. L., Allan B., Thrush T., Townsend H., Willson P., Waters E., Hecker R., Potter A.: Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. *Infect. Immun.* 2003, 71, 857-863.
9. Halpern M. D., Kurlander R. J., Pisetsky D. S.: Bacterial DNA induces murine interferon- γ production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- γ . *Cell. Immunol.* 1996, 167, 72-78.
10. Hartmann G., Weiner G. J., Krieg A. M.: CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 9305-9310.
11. He H., Genovese K. J., Swaggerty C. L., Nisbet D. J., Kogut M. H.: In vivo priming heterophil innate immune functions and increasing resistance to *Salmonella enteritidis* infection in neonatal chickens by immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007, 117, 275-283.
12. He H., Lowry V. K., Swaggerty C. L., Ferro P. J., Kogut M. H.: In vitro activation of chicken leukocytes and in vivo protection against *Salmonella enteritidis* organ invasion and peritoneal *S. enteritidis* infection-induced mortality in neonatal chickens by immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide. *Immunol. Med. Microbiol.* 2005, 43, 81-89.
13. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, 408, 740-745.
14. Huang L., Krieg A. M., Eller N., Scott D. E.: Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria. *Infect. Immun.* 1999, 67, 6257-6263.
15. Jenkins K. A., Lowenthal J. W., Kimpton W., Bean A. G. D.: The in vitro and in ovo responses of chickens to TLR9 subfamily ligands. *Dev. Comp. Immunol.* 2009, 33, 660-667.
16. Krieg A. M.: Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* 2001, 19, 618-622.
17. Linghua Z., Xingshan T., Fengzhen Z.: Vaccination with Newcastle disease vaccine and CpG oligodeoxynucleotides induces specific immunity and protection against Newcastle disease virus in SPF chicken. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007, 115, 216-222.
18. Lipford G. B., Bendigs S., Heeg K., Wagner H.: Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology* 2000, 101, 46-52.
19. Lipford G. B., Heeg K., Wagner H.: Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* 1998, 6, 496-500.
20. MacKinnon K. M., He H., Swaggerty C. L., McReynolds J. L., Genovese K. J., Duke S. E., Nerren J. R., Kogut M. H.: In ovo treatment with CpG oligodeoxynucleotides decreases colonization of *Salmonella enteritidis* in broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, 127, 371-375.
21. Mahmood M. S., Siddique M., Hussain I., Khan A., Mansoor M. K.: Protection capability of recombinant plasmid DNA vaccine containing VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus in chickens adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide. *Vaccine* 2006, 24, 4838-4846.
22. Mutwiri G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A.: Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 226-232.
23. Patel B. A., Gomis S., Dar A., Willson P. J., Babiuk L. A., Potterb A., Mutwiri G., Tikoo S. K.: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) predominantly induce Th1-type immune response in neonatal chicks. *Dev. Comp. Immunol.* 2008, 32, 1041-1049.
24. Roh H. J., Sung H. W., Kwon H. M.: Effects of DDA, CpG-ODN, and plasmid-encoded chicken IFN-gamma on protective immunity by a DNA vaccine against IBDV in chickens. *J. Vet. Sci.* 2006, 7, 361-368.
25. Scheule R. K.: The role of CpG motifs in immunostimulation and gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 44, 119-134.
26. Stacey K. J., Sester D. P., Sweet M. J., Hume D. A.: Macrophage activation by immunostimulatory DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2000, 247, 41-58.
27. Tascon R. E., Ragno S., Lowrie D. B., Colston M. J.: Immunostimulatory bacterial DNA sequences activate dendritic cells and promote priming and differentiation of CD8⁺ T cells. *Immunology* 2000, 99, 1-7.
28. Temperley N. D., Berlin S., Paton I. R., Griffin D. K., Burt D. W.: Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: A story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics* 2008, 9, 62-73.
29. Tokunaga T., Yamamoto H., Shimada S., Abe H., Fukuda T., Fujisawa Y., Furutani Y., Yano O., Kataoka T., Sudo T.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* GCG. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984, 72, 955-962.
30. Vleugels V., Ververken C., Goddeeris B. M.: Stimulatory effect of CpG sequences on humoral response in chickens. *Poult. Sci.* 2002, 81, 1317-1321.
31. Vollmer J., Krieg A. M.: Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 61, 195-204.
32. Wang X., Jiang P., Deen S., Wu J., Liu X., Xu J.: Efficacy of DNA vaccines against infectious bursal disease virus in chickens enhanced by coadministration with CpG oligodeoxynucleotide. *Avian Dis.* 2003, 47, 1305-1312.
33. Wang Y., Shan C., Ming S., Liu Y., Du Y., Jiang G.: Immunoadjuvant effects of bacterial genomic DNA and CpG oligodeoxynucleotides on avian influenza virus subtype H5N1 inactivated oil emulsion vaccine in chicken. *Res. Vet. Sci.* 2009, 86, 399-405.
34. Weeratna R., Brazolot Millan C. L., Krieg A. M., Davis H. L.: Reduction of antigen expression from DNA vaccines by coadministered oligodeoxynucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998, 8, 351-356.
35. Xie H., Raybourne R. B., Babu U. S., Lillehoj H. S., Heckert R. A.: CpG-induced immunomodulation and intracellular bacterial killing in a chicken macrophage cell line. *Dev. Comp. Immunol.* 2003, 27, 823-834.
36. Yi A. K., Chang M., Peckham D. W., Krieg A. M., Ashman R. F.: CpG Oligodeoxynucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.* 1998, 160, 5898-5906.
37. Yilmaz A., Shen S., Adelson D. L., Xavier S., Zhu J. J.: Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. *Immunogenetics* 2004, 56, 743-753.
38. Zhang L., Zhang M., Li J., Cao T., Tian X., Zhou F.: Enhancement of mucosal immune responses by intranasal co-delivery of Newcastle disease vaccine plus CpG oligonucleotide in SPF chickens in vivo. *Res. Vet. Sci.* 2008, 85, 495-502.

Adres autora: dr hab. Piotr Szeleszczuk prof. nadzw. SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: piotr_szeleszczuk@sggw.pl