

# Charakterystyka oligodeoksynukleotydów zawierających motywy CpG, ich wpływ na komórki układu odpornościowego oraz możliwości wykorzystania w medycynie i weterynarii

KLAUDIA CHRZĄSTEK, ALINA WIELICZKO

Katedra Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,  
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Chrząstek K., Wieliczko A.

## Characteristics of oligodeoxynucleotides containing CpG motifs: their influence on immune system cells and the possibilities of their application in medicine and veterinary medicine

### Summary

DNA Bacterial genomes contain many more unmethylated CpG (cytosine-phosphodiester-guanine) dinucleotides than those of vertebrates. This difference in the genome structure allows the innate immune system of vertebrates to distinguish bacterial DNA from self-DNA. Synthetic oligodeoxynucleotides that contain CpG motifs (CpG ODNs) can mimic bacterial DNA and consequently induce various types and levels of immune responses. Synthetic ODNs CpG stimulates the innate immune system, activates non-specific anti-microbial defense systems, and sensitizes antigen-presenting cells to mount both antibody and cell-mediated immunity against specific antigens. A better understanding of CpG recognition at the molecular level is fundamental to subsequent immunological response which would allow the optimization and application of CpG motifs as therapeutic agents and adjuvants for numerous diseases. It is to be hoped that CpG ODN treatment of animals could also provide a cost-effective alternative to antibiotics by increasing resistance to disease-causative pathogens.

**Keywords:** CpG oligodeoxynucleotides, chicken, cytokines/chemokines, innate immunity, adaptive immunity

Pierwsze informacje, że bakteryjne DNA (bDNA) posiada immunostymulujący efekt i aktywuje komórki NK (natural killer), podczas gdy DNA kręgowców takiej zdolności nie posiada, podali w 1992 r. Yamamoto i wsp. (30). Przypisali ten fenomen własnym komplementarnym palindromom zawartym w bDNA. Następne badania Kriega i wsp. (16) wykazały, że immunostymulujący efekt bDNA związany jest z obecnością dużej liczby niemetylowanych CpG dinukleotydów. Dodatkowo wykazali, że efekt ten nie jest związany z drugo- lub trzeciorzędową strukturą DNA. Motywy CpG znajdują się również w DNA kręgowców, jednakże częstotliwość ich występowania wynosi 1/64 par zasad, podczas gdy u bakterii występują z częstotliwością 1/16, ponadto u kręgowców zazwyczaj cytozyna ma przyłączoną grupę metylową (20). Oprócz bakteryjnego DNA, motywy CpG znajdują się także w DNA owadów i pasożytów wielokomórkowych.

Aktywowanie układu odpornościowego przez zawierające sekwencje CpG DNA organizmów niższych stanowi jeden z ważniejszych mechanizmów szybkiej, nieswoistej obrony przed czynnikami infekcyjnymi oraz jest wstępem do indukcji odpowiedzi swoistej, regulowanej głównie przez limfocyty Th1. Optymalne ODNs (oligodeoxynucleotides) zawierają palindromiczne heksamery o składzie: 5'-puryna-puryna-CG-pyrimidyna-pyrimidyna-3'. Działalność stymulująca oraz osiągnięcie konkretnego efektu ze strony układu odpornościowego przez CpG-ODN zależy od ogólnej jego budowy i składu – innych niż CpG – nukleotydów, bowiem niektóre CpG-ODN działają silnie aktywująco na limfocyty B, inne zwiększają aktywność komórek NK. Generalnie występują w formie XCGY, w której X i Y może być każdym podstawnikiem z wyjątkiem C i G (16). Zwiększając liczbę sekwencji CpG wzrasta efekt immunostymulujący. Natomiast utrata zdolności pobudzenia układu odpornościowe-

go nastąpi w przypadku ich braku bądź metylacji. Dodatkowo można stwierdzić, iż różne gatunki zwierząt odpowiadają na różne motywy CpG. Optymalna sekwencja dla komórek odpornościowych gryzoni jest otoczona od 5' końca przez dwie zasady purynowe, natomiast od 3' końca przez dwie pirymidyny, podczas gdy najlepszy motyw CpG dla komórek odpornościowych człowieka jest GTCGTT (11, 15, 16).

Syntetyczne, niemetylowane CpG oligodeoksy nukleotydy (ODNs) mogą imitować immunostymulującą aktywność bDNA i modulować odpowiedź immunologiczną różnych komórek: limfocytów, makrofagów/monocytów, komórek dendrytycznych i komórek NK. Immunomodulujący efekt CpG ODNs jest związany ze wzrostem produkcji prozapalnych cytokin, proliferacją komórek, regulacją ekspresji markerów powierzchniowych czy też cząstek MHC (15, 25, 29). Wzór rozpoznawania receptorów systemu odpornościowego umożliwia rozróżnianie pewnych prokariotycznych DNA przez detekcję niemetylowanych dinukleotydów CpG. Efektem związania CpG jest poliklonalna aktywacja i proliferacja limfocytów B, niezależne od pomocy limfocytów T, co wiąże się z wytwarzaniem przeciwciał i czynników antyapoptycznych (20). Posiadają zatem właściwości immunogenne, czyli są zdolne do wywołania przeciw sobie swoistej odpowiedzi immunologicznej.

Bakteryjne DNA lub syntetyczne oligodeoksy nukleotydy zawierające sekwencje CpG są rozpoznawane przez komórki APC (antigen presenting cells), które w dalszym etapie reakcji wytwarzają zwiększoną liczbę cytokin prozapalnych, jak np. IFN-1, beta, gamma, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-1, GM-CSF. Następuje wzrost liczby cząsteczek kostymulujących oraz cząsteczek MHC klasy II na ich powierzchni (17). Zostaje także uruchomiona odpowiedź typu komórkowego, przede wszystkim ze strony limfocytów Th (CD3CD4) oraz cytotoksycznych komórek NK (11, 14, 20).

W wykrywaniu antygenów bakteryjnych ważne są receptory rozpoznające molekularne wzorce patogenów (PAMP – pathogen associated molecular patterns), które wchodzi w skład pierwszej linii odporności wrodzonej. Do tego typu receptorów należą: TLR (toll like receptors) (1, 3), białka rozpoznające peptydoglikan (PGRPs – peptidoglycan recognition proteins) (18), receptor TREM1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) (4), białka NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) (8).

TLR są wyspecjalizowanymi cząsteczkami rozpoznającymi niektóre konserwatywne elementy strukturalne bakterii, pasożytów, grzybów i wirusów. Znajdują się na powierzchni komórek nabłonkowych jelit, dróg oddechowych, adipocytów, komórek tucznych, komórek dendrytycznych, makrofagów. TLR9 rozpoznaje niemetylowane oligonukleotydy bakteryjnego DNA. Wewnątrzkomórkowe domeny receptorów TLR – TIR (od Toll-IL-R) wykazują homologię z receptorem dla IL-1 (IL-1R). W przekazywaniu sygnału z TIR

biorą udział 4 białka adaptorowe: MyD88, MAL/TIRAP (MyD88 – adaptor-like/TIR-associated protein), TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon) i TRAM (Toll-receptor associated molecule). Dzięki tym białkom możliwe jest związanie kinaz IRAK 1,2,7 (IL-1R-activating kinase), które z kolei aktywując TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), umożliwiają uruchomienie czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB i natychmiastową aktywację cytokinowych genów promotorowych. W związku z tym aktywowane poprzez receptor TLR komórki, np. makrofagi, rozpoczynają w ciągu 60-90 minut produkcję cytokin prozapalnych (1).

Badania *in vitro* i *in vivo* z użyciem CpG ODNs pokazują bezpośredni wpływ na wzrost produkcji IgM, zwiększenie odpowiedzi komórek efektorowych pierwotnej odpowiedzi immunologicznej oraz indukują Th-1 zależną produkcję cytokin, jak INF-gamma i IL-12, które prowadzą do uruchomienia pierwotnych i wtórnych mechanizmów odpornościowych przeciwko różnym bakteriom i pasożytom, jak np. *Listeria*, *Francisella*, *Leishmania*, *Escherichia coli* czy *Salmonella* (2, 5, 12, 13, 15, 19, 22, 26, 27, 32).

W medycynie ODN-CpG wykorzystywane są np. u noworodków, u których reakcje obronne organizmu od początku są zdominowane przez komórki Th2. W takim przypadku podanie CpG pozwala wzbudzić odpowiedź ze strony Th1, dzięki czemu szybciej powstają mechanizmy odpowiedzi komórkowej (2). Są także wykorzystane w alergologii (w przypadku chorób alergicznych, w których obserwowana jest nadmierna aktywacja limfocytów Th2), motywy CpG mogą przesunąć profil reakcji immunologicznej w kierunku odpowiedzi typu Th1. W konsekwencji wzrasta wytwarzanie przeciwciał IgG2, a zmniejsza się synteza przeciwciał IgE, odpowiedzialnych za rozwój choroby (6, 9, 10). Prowadzone są także badania nad wykorzystaniem ODN jako adiuwantów w szczepionkach terapeutycznych oraz przeciwnowotworowych.

Oligodeoksy nukleotydy wykorzystywane są także w terapii antysensownej, która, mimo iż rozpatrywana jest razem z terapią genową, posiada inny mechanizm działania. Terapia genowa jest strategią, która polega na wprowadzeniu genów do komórek lub tkanek w celu zwalczania chorób wywołanych obecnością odmiennego allelu. W związku z tym głównym założeniem jest zmiana defektywnego allelu na funkcjonalny. Natomiast w przypadku terapii antysensownej głównym celem jest zablokowanie ekspresji zmutowanego allelu poprzez niedopuszczenie do zsyntetyzowania niepożądanego białka, uprzednio powodując degradację jego mRNA. Ponieważ w cytoplazmie heterodupleksy DNA/RNA są natychmiast degradowane, możliwe jest wprowadzenie oligodeoksy nukleotydów komplementarnych do określonej sekwencji mRNA w celu wyciszenia określonego transkrypty, np. antysensowne oligodeoksy nukleotydy zostały wykorzystane do wyciszenia ekspresji białka HST-1/FGF-4

w mysim modelu ludzkiego nowotworu jąder (7). W terapii przeciwnowotworowej wykorzystano także antysensowe oligonukleotydy dla mRNA ODC. ODC – dekarboksylaza ornitynowa jest enzymem pełniącym główną rolę w metabolizmie substancji (poliamidów), niezbędnych komórce do wzrostu i różnicowania, a których podwyższone stężenie zaobserwowano w komórkach nowotworowych (17, 24, 26). W badaniach *in vitro* wykorzystano trzy linie komórkowe imitujące komórki raka żołądka, raka okrężnicy, mięśniakomięsaka prądkowanego. Podanie ODNs znacząco hamowało rozwój komórek nowotworowych (21).

W ostatnich latach prowadzone są także liczne badania nad możliwością wykorzystania ODNs-CpG w produkcji drobiarskiej. Wyniki wskazują na pobudzenie zarówno pierwotnej, jak i wtórnej odpowiedzi immunologicznej u ptaków. Zhang i wsp. (31) badali możliwość wykorzystania CpG ODNs jako adjuwantów podawanych na błony śluzowe, razem ze szczepionką przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu (ND). CpG ODN spowodowały wzrost poziomów IgG w surowicy, poliklonalną proliferację limfocytów T, jak również przyczyniły się do wytworzenia odpowiedzi immunologicznej ze strony układu odpornościowego związanego z błonami śluzowymi, co manifestowało się zwiększeniem poziomów IgA przeciwko użytemu antygenowi. Można zatem stwierdzić, że CpG ODN podane donosowo efektywnie stymulowały zarówno odpowiedź ogólną, jak też odpowiedź ze strony błon śluzowych. CpG ODN podawano u ptaków również parenteralnie, w celu ochrony nowo wyklutych piskląt przed zakażeniem *Escherichia coli*. Odpowiedź ze strony pobudzonych komórek układu odpornościowego manifestowała się wzrostem produkcji cytokin: IL-18, IFN-gamma, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, co świadczy o pobudzeniu limfocytów Th1, które z kolei można uważać za komórki pełniące znaczącą rolę w protekcji przeciwko zakażeniom u piskląt (22).

Taghavi i wsp. (27) wykorzystali immunomodulujący efekt CpG u kurcząt zakażonych eksperymentalnie *Salmonella* Typhimurium. W celu sprawdzenia ochronnego efektu syntetycznych oligodeoksynukleotydów motywy CpG ODN zostały podane jednodniowym kurczętom, które w dalszym etapie eksperymentu zostały zakażone wym. drobnoustrojem. W grupie kurcząt, które nie otrzymały ODN-CpG, odsetek przeżywalności wyniósł 40-45%, natomiast u ptaków, które otrzymały CpG, wzrósł do 80-85%. Stwierdzono również, że liczba bakterii *Salmonella* Typhimurium we krwi była niższa. Zdaniem autorów, otrzymane wyniki świadczą o ochronnym działaniu ODN CpG przeciw wewnątrzkomórkowym patogenom, w tym przypadku *Salmonella* Typhimurium.

Prowadzone są także badania nad możliwością wykorzystania oligodeoksynukleotydów zawierających motywy CpG jako adjuwantów szczepionek przeciwko ptasiej grypie H5N1. Wyniki wskazują, że równoczesne podanie CpG ODN wraz ze szczepionką po-

woduje wzrost poziomów IgG w surowicy i IFN-gamma oraz wyższe miano przeciwciał określane testem HI. Świadczy to o zaangażowaniu humoralnej i Th1 odpowiedzi immunologicznej oraz zwiększeniu ochronnego działania użytej szczepionki (28).

Najnowsze badania dotyczą także możliwości wykorzystania CpG ODN podawanych *in ovo* w celu zmniejszenia kolonizacji jelit przez *Salmonella* Enteritidis. Doświadczenie wykonane przez Mackinnon i wsp. (19), w którym sprawdzana była odpowiedź immunologiczna ze strony heterofilii (wybuch tlenowy oraz degranulacja ziarnistości), potwierdza, że CpG ODN stymulują pierwotną odpowiedź immunologiczną młodych kurcząt. Heterofile izolowane od dwudniowych kurcząt były stymulowane przez bakterie *Salmonella* Enteritidis i wykazywały wzrost degranulacji ziarnistości w porównaniu do grupy kontrolnej. Następnie, w dalszym etapie badania, kurczęta zostały poddane eksperymentalnemu zakażeniu *Salmonella* Enteritidis. CpG ODN podane wcześniej *in ovo* u tych kurcząt spowodowały zmniejszenie kolonizacji jelit przez *Salmonella* Enteritidis nawet ponad dziesięciokrotnie. Wyniki badań Mackinnon i wsp. (19) świadczą o możliwości wykorzystania CpG ODN podawanych *in ovo* w celu stymulowania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, w tym przypadku przeciwko *Salmonella* Enteritidis i, co równie ważne, w celu zmniejszenia kolonizacji jelit przez te bakterie.

Podsumowując – oligodeoksynukleotydy stanowią nowe podejście do wzmocnienia immunogenności. Połączone z antygenem skuteczniej aktywują makrofagi, pobudzają proliferację limfocytów B i silnie stymulują odpowiedź limfocytów Th1. Są dobrze tolerowane, stabilne, nadają się do podawania na błony śluzowe, a w przypadku ptaków także *in ovo*. W związku ze wzrostem lekooporności drobnoustrojów, być może w przyszłości będą stanowić alternatywę do stosowanej antybiotykoterapii. W medycynie ludzkiej badania prowadzone z użyciem ODN-CpG świadczą, iż niedługo będą one znajdowały szerokie zastosowanie, np. w terapii stanów alergicznych, chorób zakaźnych czy nowotworowych. Prowadzone są zarówno badania eksperymentalne z użyciem zwierząt, jak i badania kliniczne, co szczególnie dotyczy terapii antysensownej. Najbardziej zaawansowane są badania nad ODN wobec mRNA, np. dwa z nich hamują replikację wirusów cytomegalii i wirusa HIV. Kolejne oligonukleotydy wykazują aktywność antysensową wobec mRNA kinazy białkowej C oraz onkogenów c-myc i c-raf. Produkty tych genów są związane z etiologią chorób nowotworowych, m.in. przewlekłej i ostrej białaczki. W II fazie badań klinicznych znajduje się oligonukleotyd, który hamuje ekspresję białka ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) odpowiedzialnego m.in. za adhezję komórek. Istnieje szansa, że w przyszłości będzie on stosowany np. w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów czy łuszczycy. Niektóre ośrodki badawcze np. Coley Pharmaceuticals, Uniwer-

sytet Iowa i rząd Stanów Zjednoczonych posiadają również patenty na metodę otrzymywania ODN CpG w celu zastosowania ich do przesunięcia reakcji immunologicznej w kierunku Th1 oraz w celu wykorzystania ich jako adjuwantów szczepionek przeciwnowotworowych lub przeciwwirusowych (numer patentowy: EP0772619 B; US7402572 B). Prowadzone w ostatnich latach liczne badania również u zwierząt świadczą, iż w przyszłości ODN CpG mogą znaleźć wykorzystanie w weterynarii.

### Piśmiennictwo

1. *Beutler B.*: Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* 2004, 430, 257-263.
2. *Chu R., Targoni O., Krieg A., Lehmann P., Harding C.*: CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1623-1631.
3. *Cohen J.*: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, 420, 885-691.
4. *Colonna M., Facchetti F.*: TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J. Infect. Dis.* 2003, 187 Suppl 2, S397-401.
5. *Elkins K., Rhinehart T., Stibitz S., Conover J., Klinman D.*: Bacterial DNA protects mice against lethal infection by intracellular bacteria. *J. Immunol.* 1999, 162, 2991-2997.
6. *Erb K., Wohlleben G.*: Novel vaccines protecting against the development of allergic disorders: a double-edged sword? *Curr. Opin. Immunol.* 2002, 14, 633-643.
7. *Hirai K., Sasaki H., Sakamoto H., Takeshita F., Asano K., Kubota Y., Ochiya T., Terada M.*: Antisense oligodeoxynucleotide against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice. *J. Gene Medicine* 2003, 5, 951-957.
8. *Inohara N., Ogura Y., Nuñez G.*: Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002, 5, 76-80.
9. *Jain V., Kitagaki K., Kline J.*: CpG DNA and immunotherapy of allergic airway diseases. *Clin. Exp. Allergy.* 2003, 33, 1330-1335.
10. *Jain V., Kline J.*: CpG DNA: immunomodulation and remodelling of the asthmatic airway. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004, 4, 1533-1540.
11. *Klinman D.*: CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocyte to secrete IL-6, IL-12, and IFN-g. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996, 93, 2879-2883.
12. *Klinman D.*: Therapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Antisense Nucl. Acid. Drug. Dev.* 1998, 8, 181-1884.
13. *Klinman D., Conover J., Coban C.*: Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect. Immun.* 1999, 67, 5658-5663.
14. *Krieg A.*: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20, 709-760.
15. *Krieg A.*: The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12, 35-43.
16. *Krieg A., Yi A., Matson S., Waldschmidt T., Bishop G., Teasdale R., Koretzky G., Klinman D.*: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995, 374, 546-549.
17. *Kubota S.*: Ornithine decarboxylase and cancer. *Cancer J.* 1998, 11, 294-297.
18. *Liu C., Xu Z., Gupta D., Dziarski R.*: Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 34686-34694.
19. *Mackinnon K., He H., Swaggerty C., McReynolds J., Genovese K., Duke S., Nerren J., Kogut M.*: In ovo treatment with CpG oligodeoxynucleotides decreases colonization of Salmonella enteritidis in broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, 127, 371-375.
20. *McCluskie M., Weeratna R.*: Novel adjuvant systems. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2001, 1, 263-271.
21. *Nakazawa K., Nemoto T., Hata T., Seyama Y., Nagahara S., Sano A., Itoh H., Nagai Y., Kubota S.*: Single-injection ornithine decarboxylase- directed antisense therapy using atelocollagen to suppress human cancer growth. *Cancer* 2007, 109, 993-1002.
22. *Patel B., Gomis S., Dar A., Willson P., Babiuk L., Potter A., Mutwiri G., Tikoo S.*: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) predominantly induce Th1-type immune response in neonatal chicks. *Dev. Comp. Immunol.* 2008, 32, 1041-1049.
23. *Pegg A.*: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 1988, 48, 759-774.
24. *Pegg A., Shantz L., Coleman C.*: Ornithine decarboxylase as atarget for chemoprevention. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 1995, 22, 132-138.
25. *Sparwasser T., Koch E., Vabulas R., Heeg K., Lipford G., Ellwart J., Wagner H.*: Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1998, 28, 2045-2054.
26. *Taghavi A., Allan B., Mutwiri G., Foldvari M., Van Kessel A., Willson P., Babiuk L., Potter A., Gomis S.*: Enhancement of immunoprotective effect of CpG-ODN by formulation with polyphosphazenes against E. coli septicemia in neonatal chickens. *Curr. Drug Deliv.* 2009, 6, 76-82.
27. *Taghavi A., Allan B., Mutwiri G., Van Kessel A., Willson P., Babiuk L., Potter A., Gomis S.*: Protection of neonatal broiler chicks against Salmonella Typhimurium septicemia by DNA containing CpG motifs. *Avian Dis.* 2008, 52, 398-406.
28. *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.
29. *Xie H., Raybourne R., Babu U., Lillehoj H., Heckert R.*: CpG-induced immunomodulation and intracellular bacterial killing in a chicken macrophage cell line. *Dev. Comp. Immunol.* 2003, 27, 823-834.
30. *Yamamoto S., Yamamoto T., Kataoka T., Kuramoto E., Yano O., Tokunaga T.*: Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce INF and augment INF-mediated natural killer activity. *Immunol.* 1992, 148, 4072-4076.
31. *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.
32. *Zimmermann S., Egeter O., Hausmann S., Lipford G., Röcken M., Wagner H., Heeg K.*: CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol.* 1998, 160, 3627-3630.

Adres autora: prof. dr hab. Alina Wieliczko, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław; e-mail: alina.wieliczko@up.wroc.pl