

Alerjik Astım Hastalarında Subkütan İmmünoterapi ile Oluşturulmuş Yanıtsızlığın Enflamatuvar Uyarılar Tarafından Ortadan Kaldırılması

Loss of Allergen-Specific Unresponsiveness by Inflammatory Triggers in Allergic Asthmatic Patients with Subcutaneous Immunotherapy

Umut Can Küçüksezer,¹ İlhan Tahralı,¹ Suzan Adın-Çınar,¹ Esin Aktaş-Çetin,¹ Bilun Gemicioğlu,² Günnur Deniz¹

¹Istanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

İletişim adresi:

Dr. Günnur Deniz
Istanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), İmmünoloji Anabilim Dalı, 34093 Şehremini, İstanbul.
Tel: +90 212 - 4142000 / 33306
e-posta: gdeniz@istanbul.edu.tr

©2013 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2013.283

Geliş tarihi: 5 Aralık 2013
Kabul tarihi: 25 Aralık 2013

Amaç: Bu çalışmada, tolerans kırıcı moleküllerin bir immünoterapi modelinde sınanması amaçlandı.

Hastalar ve yöntemler: Bu çalışmaya başarılı subkütan immünoterapi almış astım hastaları (n=3) alındı. Heparinli kandan izole edilen periferik kan mononükleer hücreler, immünoterapi alerjenleri ve kontrol alerjenlerinin yokluğu veya varlığında, beş gün süre ile interlökin (IL)-1 β , IL-6, TLR4 ve TLR8 ligand stimülasyonu ile kültüre edildi. CFSE seyreltme yöntemi ile akım sitometrisi kullanılarak CD4⁺ T hücre proliferasyonu incelendi.

Bulgular: Hastaların tümünde immünoterapi alerjenlerine CD4⁺ T hücre yanıtsızlığı mevcuttu. Bu yanıtsızlığın IL-1 β uyarımı ile ortadan kalktığı, ancak bazı kontrol alerjenlerine yanıtsızlığın sürdüğü gözlemlendi.

Sonuç: Alerjik hastalık frekanslarındaki artışın frenlenebilmesi, çevresel tolerans mekanizmaları ve bu yollar üzerinde etkili faktörlerin iyi anlaşılması ile mümkün olabilecektir. Toleransı kıran faktörlerin iyi belirlenmesi ile daha etkili çevresel tolerans oluşturma yöntemlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

Anahtar sözcükler: Alerjen; astım; immünoterapi; enflamasyon; çevresel tolerans.

Objectives: This study aims to test tolerance-breaking molecules in an immunotherapy model.

Patients and methods: Asthmatic patients (n=3) with successful subcutaneous immunotherapy were enrolled to study. Peripheral blood mononuclear cells isolated from heparinized blood were cultured in the absence or existence of immunotherapy allergens and control allergens, under interleukin (IL)-1 β , IL-6, TLR4- and TLR8-ligand stimulation for five days. CD4⁺ T cell proliferation was investigated by flow cytometry, with CFSE dilution method.

Results: All patients were CD4⁺ T cell unresponsive to immunotherapy allergens. This unresponsiveness was broken by IL-1 β stimulation; however, it was maintained in the presence of certain control allergens.

Conclusion: It is requisite to understand peripheral tolerance mechanisms and influential factors on these pathways to minimize the incidence of allergic diseases. It is possible to develop more effective and novel peripheral tolerance induction modalities by defining the factors which are capable of breaking peripheral tolerance.

Key words: Allergen; asthma; immunotherapy; inflammation; peripheral tolerance.

Alerjik hastalıkların görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki nüfusun %30'u alerjik hastalıklardan etkilenir iken %10-12 kadarı ise astımdan etkilenmektedir.^[1] Astım, eozinofil, mast hücreleri ve aktive olmuş T lenfositlerinin yoğun olarak bulunduğu, kronik enflamasyon ile karakterize bir solunum yolu

hastalığıdır ve temel bulgularını havayolu enflamasyonu ve bronkokonstriksiyon oluşturmaktadır.^[2] Hastalığın en yaygın grubunu atopik, yani alerjik astımlılar oluşturmaktadır.^[2] T hücrelerinde alerjenlere özgü yanıtsızlık uyarıyı amaçlayan immünoterapi, alerjik hastalıkların tedavisinde önemli bir dönüm noktası olmuştur ve etki

mekanizmaları henüz aydınlatılmaktadır.^[3] Alerjik enflamasyon olaylarının hepsi T hücre aktivasyonu gerektirdiğinden, alerjenlere karşı sağlanacak T hücre toleransının patolojik olayların önüne geçebileceği bildirilmiştir.^[4] Alerjene özgü regülatör T (Treg) hücrelerinin oluşumu ve bu hücrelerin baskılayıcı sitokinleri olan interlökin (IL)-10 ve transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)'nın üretimleri, temel alerjenlere karşı baskılanmış proliferatif yanıt ve azalmış sitokin salgıları ile karakterize olan çevresel T hücre toleransının açığa çıkmasını sağlamaktadır.^[4] İmmünoterapinin mast hücreleri, eozinofiller gibi efektör hücrelerin sayısında ve aracı salınımlarında azalmaya yol açarak hastalığın klinik seyirinde düzelmelere neden olduğu iddia edilmektedir.^[5,6] Alerjene özgü immünoterapi, doğal kaynaklardan elde edilmiş alerjen özütlelerinin kullanımı ile gerçekleştirilmekte ve üç ila beş yıl kadar sürmektedir. Standardize edilmiş alerjen özütleleri, "aşı" olarak adlandırılmaktadır.^[7] Tedavi sonucunda mast hücreleri, bazofiller ve eozinofillerin deri, burun, göz ve bronşiyal mukozada toplanmalarında azalma, alerjene özgü IgA ve IgG4 düzeylerinde artma, IgE düzeylerinde ise azalma gerçekleşmektedir. Toleransın uyarılması günler ile aylar içerisinde gerçekleşmekte ancak oluşan tolerans, yıllarca sürebilmektedir.^[8]

Alerjene özgü çevresel toleransın ortadan kaldırılması ise yeni incelenmekte olan bir konudur. Yakın zamandaki çalışmalar, sağlıklı bireylerde oluşmuş alerjene özgü toleransın enflamatuvar faktörlerle ortadan kaldırıldığını göstermektedir. Enflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-6 ile yine enflamasyon tetikleyicileri olan TLR4 (Toll-like reseptörler-4) ve TLR8 ligandlarının, alerjen yanıtları önceden bilinen sağlıklı bireylerde alerjene özgü çevresel T hücre toleransını kaldırarak CD4⁺ T hücre proliferasyonunu tetikledikleri gösterilmiştir. T hücre yanıtızlığının ortadan kalkması, alerjen uyarımlı hastalık semptomlarının ortaya çıkabilmesi için ilk basamağı oluşturduğundan, bu etkinin gözlemlendiği bireylerde immünoterapi etkisinin ortadan kalkabileceği ileri sürülmektedir.^[9]

Sağlıklı bireylerde etkili olduğu bilinen tolerans kırıcı faktörlerin immünoterapi sonucu oluşturulmuş alerjene özgü çevresel toleransın kaldırılması yönündeki etkilerini inceleyen bu çalışma, immünoterapi sonucu tolerans geliştirdikleri bilinen alerjik astım hastalarında immünoterapi alerjenine karşı yanıtızlığın enflamatuvar uyarımlarla ortadan kaldırılmasını incelemektedir.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Hasta grubu

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından takipleri gerçekleştirilen, subkütan immünoterapi sonu-

cu yanıtı oldukları alerjenlere karşı çevresel tolerans geliştirdiği bilinen ve sistemik ilaç kullanmayan alerjik astım hastaları (n=3) dahil edildi. Çalışma İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmaya alınan hastalar çalışma hakkında bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş hasta onam formunu doldurmaları istendi, bu işlemin ardından hastalardan kan örnekleri alındı. Hastalara ait bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

Periferik kan mononükleer hücrelerin eldesi

Hastalardan heparinli tüplere alınan 20 ml periferik venöz kan örnekleri 1:1 oranında fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) ile sulandırıldıktan sonra oda ısısına getirilmiş Ficoll (Biochrom, AG, Berlin, Germany) üzerine, 50 ml'lik konik tabanlı Falcon tüpü içerisinde, (1:2) (fikol:kan) oranında yayıldı, 800 G güçte, 20 dakika süreyle ve +20 °C'de santrifüjü takiben ara tabakayı oluşturan periferik kan mononükleer hücreler (PKMH), pastör pipeti vasıtası ile toplanarak bir başka Falcon tüpüne aktarıldı. Fosfat tampon tuz çözeltisi ile santrifüjde üç kez, 300 G güçte, 10 dakika süreyle, +8 °C'de yıkanan PKMH, daha sonra Neubauer hücre sayma kamarası kullanılarak ışık mikroskobu altında sayılmış ve kullanımlarına kadar olan sürede buz içerisinde bekletilmiştir.

Karboksi floresein süksinimidil diester (CFSE) ile periferik kan mononükleer hücrelerin işaretlenmesi

Karboksi floresein süksinimidil diester (Molecular Probes, Leiden, Almanya) boyası kullanılarak hücre çoğalmasının akan hücre ölçer ile değerlendirilmesi, çoğalan hücre grubunun da değerlendirilmesini sağlaması nedeni ile çalışmada tercih edildi. Periferik kan mononükleer hücreler 1 ml içerisinde en fazla 2x10⁷ hücre olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Çözelti içerisine CFSE boyası (5 μ M/ml) eklendikten sonra +4 °C'de, karanlıkta altı dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler PBS ile santrifüjde 800 G güçte üç dakika süre ile +4 °C'de üç kez yıkandı ve takiben tripan mavisi ile Neubauer hücre sayma kamarası kullanılarak ışık mikroskobu altında sayıldı. Hücreler, kullanım aşamalarına kadar, buz içerisinde bekletildi.

Hücre kültürleri

Periferik kan mononükleer hücreler, CFSE ile boyanmalarının ardından uyarıcı koşullar altında, 120 saat süre ile, +37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edildi. Hücre kültürleri için fetal sıgır serumu (50 ml, Bio Concept Altmark GmbH, Kloetze, Ortsteil Kusey - Germany), penisilin/streptomisin karışımı (5 ml, 100x, Gibco-BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany), kanamisin (5 ml, 100x, Gibco-BRL Life Technologies GmbH,

Karlsruhe, Germany), MEM vitamin (10 ml, 100x, Gibco-BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany), L-glutamin (5 ml, 2 mM, Gibco-BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany), sodyum piruvat (10 ml, 100x, Gibco-BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) ile zenginleştirilerek RPMI-1640 (500 ml, Gibco-BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) (C-RPMI) kullanıldı. Hücreler, TLR4 ligandı (100 ng/ml, Sigma-Aldrich, Seelze, Germany), TLR8 ligandı (1 uM/ml, 3M AG, Rüşchlikon, Switzerland), IL-1 β (5 ng/ml, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) ve IL-6 (5 ng/ml, PeproTech GmbH, Hamburg Germany) sitokinleri ile, Der P2, Bet v1, Phl p2 (10 ug/ml, Allergopharma Ltd, Zurich, Switzerland) alerjenleri varlığı veya yokluğunda kültüre edildi ve kültürün 5. gününde CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyon kapasitesi akan hücre ölçerle değerlendirildi.

Akan hücre ölçer yöntemiyle hücre çoğalmasının analizi

Farklı koşullardaki PKMH örneklerinin anti-CD4-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) antikoru ile 20 dakika karanlıkta inkübasyonu takiben, bir kez PBS ile yıkandı %1 paraformaldehitli PBS eklenerek analize kadar +4 °C'de ve karanlıkta saklandı. Akan hücre ölçer cihazında önden saçılım (FS)-yandan saçılım (SS) grafiğinde işaretlenen lenfosit kapısı içerisinde FITC ve PE floresan şiddetlerini gösteren dot-plot ekranı ile çalışıldı. Farklı deney koşullarında farklı uyarılar altında çoğalan CD4⁺ T hücre yüzdeleri Cell Quest yazılımı kullanılarak FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) cihazı ile saptandı, demonstratif grafiklerin düzenlenmesi için WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) 2.9 programı (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) kullanıldı.

İstatistiksel analizler

Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında Windows için 15.0 versiyon SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) yazılımı kullanıldı, proliferasyon verilerinin değerlendirilmesinde ise non-parametrik Wilcoxon testi uygulandı. P<0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hastalara ait klinik veriler Tablo 1'de verilmiştir. Tüm hastaların immünoterapi öncesi alerjen yanıtları deri testleri ile belirlendi. Hastaların tamamının ev tozu akarı alerjeni olan **Der P1**'e karşı subkütan immünoterapi gördüğü bilinmekte idi.

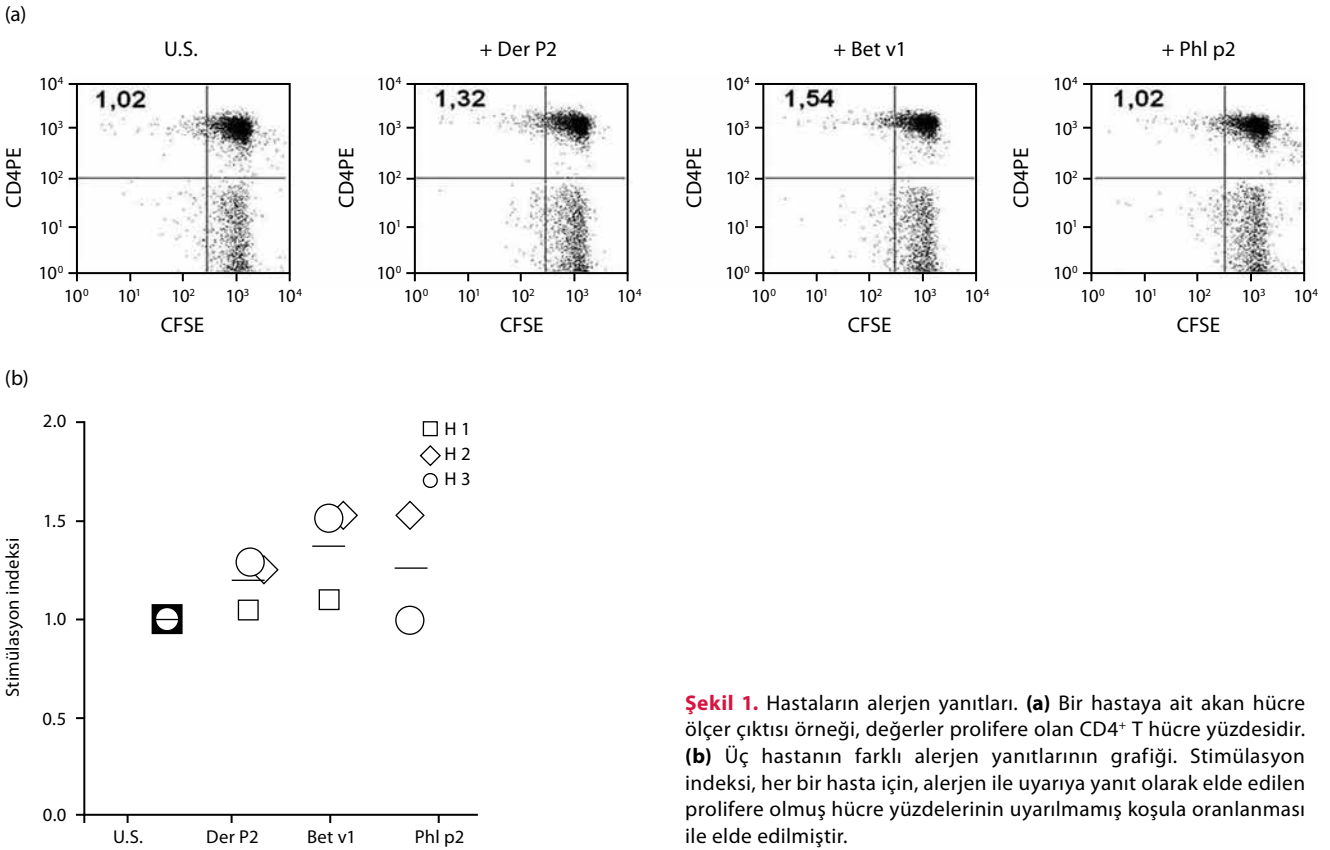
Hastaların alerjenlere özgü T hücre yanıtları birbirlerinden farklıdır. Örneğin, 3 no'lu hastanın akan hücre ölçer çıktıları incelendiğinde, hastanın immünoterapi alerjeni olan Der P2'ye karşı düşük T hücre yanıtı verdiği, kontrol alerjenlerinden Bet v1'e daha güçlü yanıt verdiği, **Phl p2** alerjenine ise yanıtız olduğu görüldü (Şekil 1a). Hastadan hastaya farklı olan CD4⁺ T hücre yanıtları, stimülasyon indeksi kullanılarak bir araya getirildiğinde, uyarılmamış koşulla karşılaştırmalı olarak alerjen yanıtları gösterildi (Şekil 1b). Genel olarak incelendiğinde en düşük yanıtın immünoterapi alerjeni olan Der P1'e karşı olduğu dikkat çekti. Hastaların immünoterapi öncesi gerçekleştirilen deri testlerinde Der P1 alerjenine yanıtız oldukları göz önüne alındığında immünoterapi etkisi ile baskılanmış Der P1 yanıtı görüldü. Çim poleni alerjeni olan Phl p2'ye yanıtız olan 2 no'lu hastanın ise immünoterapi görmediği bu alerjene karşı Der P2 ile karşılaştırıldığında daha güçlü yanıt verdiği dikkat çekti. Huş ağacı poleni alerjeni olan Bet v1 ise 2 ve 3 no'lu hastalarda T hücre yanıtı uyarmaktadır (Şekil 1a). Bulgular ışığında, yanıtız alerjenler içerisinde en düşük yanıtın immünoterapi alerjenine verildiği görüldü.

Alerjene özgü çevresel toleransı kaldırabildikleri bilinen uyarılar olan IL-1 β ve IL-6 ile TLR4 ve TLR8 ligandları ile beş günlük uyarımın ardından CD4⁺ T hücre proliferasyonları değerlendirildiğinde, IL-1 β ile uyarımın, tüm hastalarda immünoterapi alerjenine karşı oluşmuş çevresel toleransı ortadan kaldırdığı görüldü. Bir no'lu hastaya ait örnek çıktıda, IL-1 β uyarısının özgül olmayan T hücre proliferasyonunu tetiklediği, normalde hastanın yanıtız olduğu immünoterapi alerjeni olan Der P2'ye karşı söz konusu sitokin uyarısı ile yanıtın başladığı dikkat çekmektedir. Bu sitokin, aynı hastada Bet v1 yanıtızlığını da ortadan kaldırmaktadır (Şekil 2a). Stimülasyon indeksi grafiğinde ise IL-1 β 'nin enflamatuvar ve tolerans kırıcı etkileri açıkça görülmektedir. İnterlökin-1 β uyarımı, uyarılmamış koşula göre proliferasyonu anlamlı olarak artırmakta, sitokin

TABLO 1

Çalışmaya katılan hastalara ait klinik bilgiler

Hastalar	Doğum yılı	Cinsiyet	Deri testi durumu	İmmünoterapi alerjeni
1	1982	Erkek	Tüm alerjenler (+)	Ev tozu akarı
2	1940	Kadın	Der P(+) Phl p (+)	Ev tozu akarı
3	1980	Kadın	Der P(+)	Ev tozu akarı



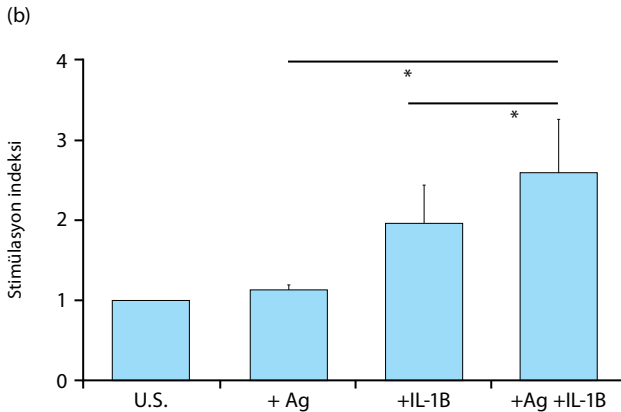
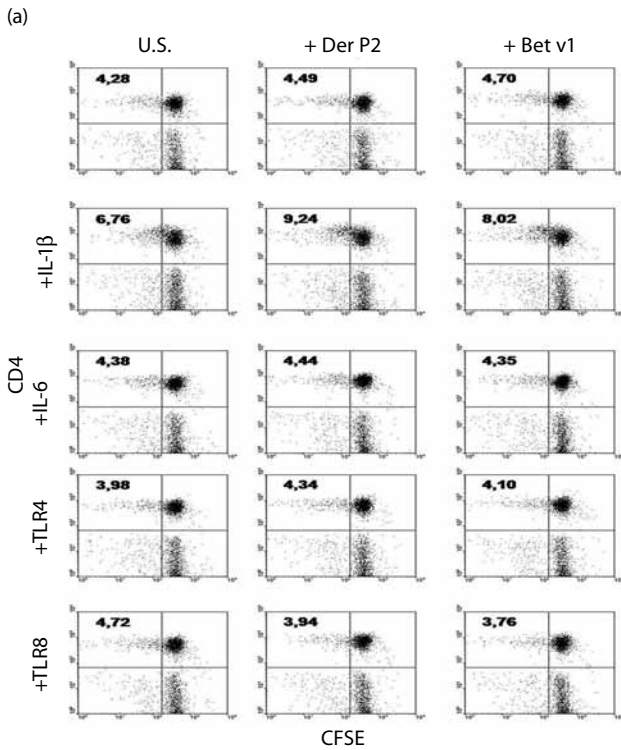
ve alerjenlerin bir arada bulunması durumunda ise hem uyarılmamış koşul hem tek başına alerjen hem de tek başına IL-1 β uyarımı koşullarına göre hücre proliferasyonu anlamlı derecede artmaktadır (Şekil 2b).

TARTIŞMA

Alerjik hastalıklarda çevresel tolerans oluşturulmasında güçlü bir yöntem olarak klinikte kullanılan immünoterapinin, immün sistemin ortamsal antijen ya da alerjenlere adaptasyon yeteneğine dayanmakta olduğu ve alerji, astım ve otoimmün hastalıklarda normal immüniteyi sağlayabileceği ileri sürülmektedir.^[10] İmmünoterapi uygulanarak belirli alerjenlere duyarsız hale getirilmiş hastalar, çevresel toleransı ortadan kaldırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan moleküllerin etkilerinin sınanması için uygun bir model oluşturmaktadır. Alerjen yanıtları bilinen ve yanıtlı oldukları alerjene karşı duyarsızlaştırılmış alerjik astım hastalarının periferik kanlarından PKMH'leri saflaştırıldı, tolerans kırıdığı bilinen IL-1 β ve IL-6 sitokinleri ile TLR4 ve TLR8 ligandları ile toleranslı oldukları alerjen ile beraber bir başka kontrol alerjeninin varlığı veya yokluğunda uyarıldı. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar, tolerans geliştirilmiş olan alerjene yanıtızlığın IL-1 β uyarımına bağlı olarak ortadan kalktığını ve alerjene

yanıt olarak T hücre çoğalmasının yeniden başladığını gösterdi. İnterlökin-1 β , sağlıklılarda olduğu gibi yalnız başına da güçlü T hücre proliferasyonuna neden olmakta, alerjenin ortamda varlığı durumunda ise tolerans kırıcı olarak davranmakta idi. Her üç hastada da, IL-1 β uyarımına yanıt olarak alerjenlere özgü proliferasyonun gerçekleşmesi, hastanın kontrol alerjenine de duyarlı ama yanıtız durumda olduğunu, immünoterapi görülen alerjene toleransın ise subkütan immünoterapi ile kazanılmış olduğunu düşündürdü.

İnterlökin-1 β ile uyarım ile alerjen yokluğunda başlayan T hücre proliferasyonu, daha önceden saptanmış IL-1 β 'nin özgül olmayan proliferatif etkisine bağlıdır.^[9] IL-1 β , immünoterapi alerjenine karşı T hücre proliferasyonunu başlatarak tolerans kırıcı etki göstermektedir.^[9] İnterlökin-6, TLR4 ve TLR8 uyarımları, bu hastalarda tolerans kırıcı etki göstermedi. Üç hastadan elde edilen sonuçlar, hastaların immünoterapi görmüş oldukları alerjenlere, CD4⁺ T hücrelerinin yanıtız veya zayıf yanıtılı olduklarını gösterdi. İnterlökin-1 β sitokininin sağlıklılarda saptanmış olan ve özgül olmayan T hücre çoğalmasını tetikleyici özelliği hastalarda da gözlemlendi. Ortamda var olan alerjenin üzerine IL-1 β uyarısı eklendiğinde, alerjen ve sitokinin tek başlarına uyardıklarından çok daha yüksek T hücre proliferasyonu gözlenmekte



Şekil 2. İnterlökin-1β ile uyarım, alerjene özgü çevresel T hücre toleransını kırıcı etki gösterir. (a) Bir hastaya ait örnek akan hücre ölçer çıktısında, Der P2 ve Bet v1 alerjen yanıtı IL-1β etkisi ile ortadan kaldırılmaktadır. (b) Kümülatif veri grafiğinde IL-1β'nin tolerans kırıcı etkisi görülmektedir. Üç hastanın alerjene yanıtı olduğu toplam beş farklı koşulda yanıtı IL-1β etkisiyle ortadan kaldırılmaktadır. Grafikte koşullara ait stimülasyon indeksleri; ortalama ± standart hata olarak sunulmaktadır; * p<0.05, Wilcoxon testi.

olup bu bulgu toleransın kırılmasına işaret etmektedir.^[9] Çalışmamızda kullanılan diğer enflamatuvar uyarıların immünoterapi ile gelişen toleransı kırma konusunda başarılı olmadıkları gözlemlendi.

Sonuç olarak, bulgularımız doğal immün sistem yapıtaşlarının edinsel immün yanıt üzerinde etkili olabileceğini, sağlıklı bireylerde de çeşitli mikrobiyal ya da enflamatuvar uyarılar altında alerjik hastalıkların ortaya

çıkabileceğini, çevresel toleransın temelinde oldukça karışık bir mekanizmanın bulunduğunu, farklı moleküllerin farklı etki mekanizmaları ile tolerans kaybında etkili olabileceklerini göstermektedir.

Alerjik hastalık frekanslarındaki artışın frenlenebilmesi, çevresel tolerans mekanizmaları ve bu yollar üzerine etki eden faktörlerin iyi anlaşılması ile mümkün olabilecektir. Toleransı kıran faktörlerin iyi belirlenmesi ile belki de daha etkili çevresel tolerans oluşturma yöntemlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

Teşekkür

Yazarlar, Prof. Dr. Mübeccel Akdiş ve Prof. Dr. Cezmi Akdiş'e başta alerjenlerin sağlanması ve diğer her türlü destekleri için teşekkürlerini sunarlar.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2826).

KAYNAKLAR

- Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008;8:193-204.
- Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 2009;71:489-507.
- Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Specific immunotherapy and turning off the T cell: how does it work? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;107:381-92.
- Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy* 2009;39:626-39.
- Creticos PS, Adkinson NF Jr, Kagey-Sobotka A, Proud D, Meier HL, Naclerio RM, et al. Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy. *J Clin Invest* 1985;76:2247-53.
- Rak S, Löwhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:470-80.
- Cramer R, Rhyner C. Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2006;18:761-8.
- Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999;341:468-75.
- Kucuksezer UC, Palomares O, Rückert B, Jartti T, Puhakka T, Nandy A, et al. Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:875-85.
- Akdis M, Akdis CA. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:645-60.