

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVA V PRAZE

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE

PRAHA 2010

## **Bakalářská práce**

# **Srovnání imunitního systému novorozenců a dospělých**

Adéla Dusilová

Školitel: RNDr. Jiří Hrdý

Děkuji svému školiteli RNDr. Jiří Hrdému za pomoc, velkou dávku trpělivosti a totální nasazení při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří při tvorbě této práce trpěli a i přesto mě vydatně podporovali – své rodině a kamarádům.

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: Srovnání imunitního systému novorozenců a dospělých jsem vypracovala sama s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2010

Adéla Dusilová

## Abstrakt

Ve srovnání s imunitním systémem (IS) dospělých jedinců je možné IS novorozenců obecně charakterizovat jako nezralý. Z klinického pohledu novorozenci vykazují zvýšenou náchylnost k infekcím. Kojení může přispívat ke snížení výskytu onemocnění, neboť dodává do intestinálního slizničního systému protilátky z krve matky, důležité živiny a další imunoregulační komponenty. Mateřské mléko nahrazuje v krvi novorozence specializované imunoglobuliny – zejména IgA, jehož koncentrace dosahuje hodnot dospělých jedinců nejdříve za dva roky, ale i déle (až období puberty). Ostatní třídy protilátek se v pupečnickové krvi nacházejí pouze sporadicky s výjimkou IgG, který je přenášen transplacentárně. Omezená schopnost B lymfocytů produkovat protilátky je způsobena nedostatečnou expresí kostimulačních signálů na povrchu Th2 buněk. T lymfocyty obecně vykazují mnohem menší schopnost reagovat na nízké dávky stimulátorů (polyklonálních aktivátorů - rostlinných lektinů: ConA nebo PHA), vážících se na receptory T buněk v komplexu s CD3 a proliferovat v odpovědi na anti-CD3 monoklonální protilátky. Většina T lymfocytů v pupečnickové krvi vykazuje „naivní“ fenotyp CD45RA. V průběhu intrauterinního vývoje dochází ke styku IS novorozence s IS matky, a jelikož by prozánětlivá buněčná odpověď Th1 mohla vést k potratu, je upřednostněna Th2 buněčná odpověď. Preferenční Th2 typ buněčné odpovědi je typický pro novorozence i v postnatálním období. Novorozenecké lymfocyty produkují snížené množství cytokinů. Rovněž tak neonatální buňky prezentující antigen (APC) exprimují nižší hladiny kostimulačních a aktivačních molekul na svém povrchu, a proto je jejich schopnost stimulovat T buňky velmi omezená. Novorozenecké dendritické buňky preferují navození tolerance při pohlcení apoptotických nebo nekrotických buněk a sekretují snížené množství cytokinů. Přirozená neonatální imunita, která reaguje na charakteristické znaky patogenů, je funkční pouze v omezené míře. Neutrofilů jako hlavní zástupci fagocytujících granulocytů se u novorozenců charakterizují horší schopností chemotaxe, migrace a eradikace patogenů. Na neadaptivní zásahu proti patogenům se spolu s granulocyty podílí komplementové proteiny. V neonatální krvi se všechny složky komplementového systému nacházejí v nižších koncentracích než v krvi dospělých, a proto i účinnost opsonizace a lyze je deficitní.

**Klíčová slova:** neonatální imunita, imunitní systém, dospělý, dendritické buňky, cytokiny, protilátky, lymfocyty, očkování, kojení, slizniční imunita

## Abstract

In general, it is possible to characterize neonatal immune system (IS) as immature in comparison to adult IS. From a clinical point of view, newborns show an increased susceptibility to infections. Breastfeeding can contribute to the descent incidence of illnesses, because it supplies the intestinal mucosal system with antibodies of the mother's origin, important nutrients and other immunoregulatory components. Breast milk compensates decreased newborn's capacity to produce immunoglobulins— especially IgA, that concentration reaches adult levels in two years, but even later (to the pubescent period). Other classes of antibodies are found in cord blood only sporadically except IgG, which is transferred transplacentary. Reduced ability of B lymphocytes to produce antibodies is caused by insufficient expression of surface costimulatory signals of Th2 cells. T lymphocytes are not able to react properly to low doses of stimulators (polyclonal activators – phytolectins: ConA or PHA), which bind to T cell receptors in complex with CD3 and proliferate in a response to anti-CD3 monoclonal antibodies. Most of the cord blood T lymphocytes display „naive“ phenotype CD45RA. During intrauterine development, neonatal IS is in contact with mother IS and because a pro-inflammatory Th1 response could lead to abortion, Th2 cell response is preferred. Preferential Th2 response is typical for newborns even during the postnatal period. Neonatal lymphocytes produce less cytokines. As well as neonatal antigen presenting cells (APC) express lower levels of surface costimulatory and activating molecules. Neonatal dendritic cells prefer to induce tolerance after engulfing apoptotic or necrotic cells and produce little cytokines. Nonadaptive neonatal immunity, which recognizes characteristic pathogen markers, is not well developed. Neonatal neutrophils, as the main phagocyte granulocytes, are characterized by a diminished ability of chemotaxis, migration and pathogens killing. Complement proteins take part in nonadaptive eradication of pathogens together with granulocytes. All the components of the neonatal complement system reach lower levels than in adult blood that's why the opsonization and lyses are less efficient.

**Key words:** neonatal immunity, immune system, adult, dendritic cells, cytokines, antibodies, lymphocytes, vaccination, breastfeeding, mucosal immunity

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	6
<b>2. Neadaptivní imunitní mechanismy</b> .....	6
2.1 Humorální část přirozené imunity.....	7
2.1.1 Komplement .....	7
2.2 Buněčná část přirozené imunity .....	8
2.2.1 Granulocyty .....	8
2.2.2 Monocyty a makrofágy .....	10
2.2.3 Dendritické buňky .....	11
<b>3. Adaptivní imunitní mechanismy</b> .....	16
3.1 T-lymfocyty .....	16
3.2 B-lymfocyty a humorální část adaptivní imunity.....	20
<b>4. Cytokiny</b> .....	24
<b>5. Slizniční imunita</b> .....	25
<b>6. Mateřské mléko</b> .....	27
<b>7. Očkování</b> .....	28
<b>8. Závěr</b> .....	29
<b>Seznam použité literatury</b> .....	31

# 1. Úvod

Světová Zdravotnická Organizace zaznamenala 7,1 milionu dětí umírajících každoročně na infekci během prvního roku života. Nejběžnější příčiny smrti jsou akutní respirační nebo průjemová onemocnění způsobená bakteriálními a virovými patogeny. (WHO. 2004). Nezralost imunitního systému novorozence je přímou příčinou vysoké míry onemocnění a úmrtí. Cílem této práce je shrnutí rozdílů mezi imunitním systémem novorozenců a dospělých jedinců.

Nezralost a náchylnost k infekcím neonatální imunity je obecně známým faktem. Popsání a pochopení odlišností by mohlo přispět k zavedení možných praktických opatření pro zlepšení kvality života novorozenců. V první řadě se nabízí novorozenecké očkování. Současné vakcíny jsou sice účinné, ale jejich podání bývá často spojeno s nežádoucími reakcemi. Srovnání uvedené v této práci by se mohlo stát inspirací pro vývoj nových, účinnějších novorozeneckých vakcín, které by snížily mortalitu v raném věku.

Dalším problémem nabývajícím na významu v dnešní době se stávají stále rozšířenější imunopatologické reakce, autoimunitní onemocnění, nefunkční protinádorové imunitní mechanismy, transplantace, imunodeficience. Ve všech těchto oblastech by poznatky o imunitním systému novorozenců mohly najít své uplatnění. Již dlouho se vedou diskuze o využití neonatálních kmenových buněk a pochopení imunotolerance plodu v děloze matky se ukazuje jako užitečná inspirace pro transplantační zásahy. Vliv kojení na snížení výskytu atopií je neoddiskutovatelným faktem.

## 2. Neadaptivní imunitní mechanismy

Přirozená imunita je evolučně starý mechanismus založený na buňkách a molekulách, které nejsou schopny imunologické paměti, tzn. že nejsou ovlivněny předchozím setkáním s antigenem. Rozpoznávají strukturní nebo funkční rysy přítomné u patogenů (molekulární struktury asociované s patogeny PAMP = pathogen associated molecular patterns). Efektorové molekuly přirozené imunity se tvoří konstitutivně, proto jsou při setkání s patogenem schopné rychlé reakce – řádově v minutách.

## 2.1 Humorální část přirozené imunity

Mezi humorální neadaptivní mechanismy se řadí různé systémy plazmatických bílkovin produkované většinou jaterními buňkami. Nejvíce prozkoumanou a zmiňovanou částí je komplement a jeho cesty aktivace. Patří sem ale i další sérové proteiny – C-reaktivní protein, sérový amyloid A, koagulační systém ... Ostatní sérové proteiny se vyskytují v pupečnickové krvi ve stejném množství jako u dospělých jedinců a nejsou proto středem zájmu výzkumu (Lannergård A et al. 2005).

### 2.1.1 Komplement

Komplement je komplexním dynamickým systémem asi třiceti proteinů, jak sérových tak membránových, které vzájemně kooperují a mají i jiné funkce než jen v humorální složce nespecifické imunity, kde vytvořením kanálu v membráně cizorodého organismu zajistí jeho lysi (C5b - C9). Slouží jako opsoniny (C3b), některé jsou adhezivními molekulami, chemoatraktanty (C3a, C5a), aktivátory B lymfocytů (C3dg) a mohou také fungovat jako regulátory transportu antigenů do sleziny a uzlin (C3b). Hlavní funkce v obraně proti infekčním zárodkům plní devět sérových proteinů: C1 - C9. Jejich aktivace je známa třemi různými způsoby tzv. cestami: alternativní, lektinovou a klasickou. (Walport MJ. 2001.)

U novorozenců probíhá syntéza komponentů komplementu de novo, tzn. že novorozenec nezískává komplementové proteiny transplacentálním přenosem (Berger M. 1990). Koncentrace komplementových složek přítomných v séru žilní krve matky bývají porovnávány s koncentracemi v séru krve novorozenců. Toto se ale neukázalo jako vhodný ukazatel vzhledem k tomu, že u matek dochází ke zvýšení podílu jednotlivých komponent komplementu v průběhu těhotenství (Johnston RB, Altenburger KM, Atkinson AW, Curry RH. 1979). Koncentrace proteinů C1, C2, C4, C6 dosahuje 50 % oproti koncentraci přítomné v séru matky (Kohler PF. 1973), ale ve srovnání s dospělými, je téměř srovnatelná (Adinolfi MD. 1977). Množství C7 představuje 70 % koncentrace dospělých jedinců (Adinolfi M, Beck S. 1976), zatímco C8 a C9 dosahuje pouze 10 – 25 % sérových hodnot dospělých (Borzy MS, Gewruz A et al. 1988). Zastoupení proteinu C3 v séru novorozenecké krve odpovídá 50 – 75 % přítomného C3 v krvi matky (Anderson DC et al. 1983) a 60 – 80 % koncentrace C3 u dospělých (Johnston RB et al. 1979). Důsledkem nižšího zastoupení jednotlivých komponent je snížena aktivita komplementu o 50 % (vyjádřeno pomocí CH50 a APH50) (Anderson DC et

al. 1983). Další práce rozděluje jednotlivé cesty aktivace komplementové kaskády a jejich účinnost. CH50 dosahuje úrovně dospělého a APH50 pouze 50-70 % (Schelonka RL, Infante AJ. 1998).

Jak již bylo zmíněno výše, novorozenci jsou zvláště náchylní k infekcím. I nižší zastoupení jednotlivých komplementových proteinů tomu velkou měrou přispívá. Ovlivněná je hlavně chemotaxe a opsonizace (Adamkin D et al. 1978).

## **2.2 Buněčná část přirozené imunity**

Většinu buněk patřících do této části imunitního systému spojuje schopnost fagocytózy. Patří sem granulocyty, monocyty, makrofágy, dendritické buňky a NK buňky. NK buňky jsou sem zařazovány kvůli mechanismu rozpoznávání antigenů, ale svou podstatou byly původně považovány za lymfocyty. Likvidace patogenů probíhá mnoha rozličnými mechanismy intracelulárními i extracelulárními. Dendritické buňky fungují zároveň jako spojka mezi nespecifickými a specifickými složkami imunity, protože prezentují antigeny T lymfocytům.

### **2.2.1 Granulocyty**

Neutrofilní granulocyty patří mezi buňky nespecifické imunity, které zasahují především při zánětu, proti bakteriím a dalším cizorodým částicím. Pocházejí z progenitorů myeloidní linie z kostní dřeně, z nichž se diferencují a nakonec fungují jako fagocyty. V konečném stádiu vývoje imunitního systému tvoří až 70 % všech účastníků se buněk. U zdravého jedince se vyskytují převážně v kostní dřeni, do krve jsou vyplavovány během zánětu a do místa určení naváděny pomocí chemoatraktantů. Pohybují se chemotakticky po stoupajícím koncentračním gradientu. Stimulací dochází u neutrofilů k přeměně monomerního G-aktinu na filamentózní F-aktin, který umožňuje rychlé úpravy tvarů a pohyb. Spolu s těmito změnami dochází k adhezenci na endotel cév díky zvýšenému počtu selektinů na povrchu stěny cév. Na povrchu neutrofilů se pak vyskytuje L-selektin (CD62L), který iniciuje adhezi a migraci neutrofilů do postižené tkáně. V místě zánětu nebo poranění má neutrofil za úkol fagocytovat cizorodý materiál. Ten rozeznává pomocí nespecifických receptorů, ale některé bakterie nemají na svém povrchu rozeznatelné ligandy PAMP. Na ty se pak váží opsoniny a tímto činí bakterie rozeznatelné pro IS. Jako opsoniny slouží některé komplementové částice



a imunoglobuliny. Pohlcené částice jsou zlikvidovány oxidačním vzplanutím. (Schelonka RL, Infante AJ. 1998.)

Během prvních pár hodin po porodu je počet bílých krvinek značně zvýšený kvůli jejich demarginaci, která je způsobena stresem z porodu (Schelonka RL et al. 1994). Cirkulující neutrofilů přežívají v krvi asi 8 hodin, ty které se dostanou do tkání, dokonce dalších 24 hodin.

Zásoba neutrofilů v kostní dřeni novorozenců je oproti dospělým značně snižena – 25 % hodnoty dospělých lidí, proto se při případné sepsi velmi rychle vyčerpá. Při delší infekci pak u novorozenců dochází k neutropenii z důvodu nedostatku neutrofilů, které by mohly proliferovat. Novorozenecký IS není schopen rychle zvýšit tvorbu neutrofilů. (Christensen RD et al. 1982)

Často diskutovaná náchylnost novorozenců k bakteriálním infekcím je též způsobena deficiencí granulí obsahujících baktericidní a permeabilitu zvyšující protein (BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) v neutrofilech . BPI se váže na povrch lipopolysacharidů gramnegativních bakterií a eradikuje je (Ofer Levy et al. 1999). Další příčinou nižší neonatální odolnosti je neschopnost novorozenců vytvořit neutrofilní extracelulární past (NET = neutrophil extracellular trap), která je zodpovědná za mimobuněčné zabíjení mikroorganismů. (Yost ChC et al. 2008)

Na povrchu neutrofilů novorozenců lze pozorovat sníženou expresi L-selektinu, která se vyrovnává kolem patnáctého roku života. Zajímavé ale je, že u plodu a u předčasně narozených novorozenců dosahuje exprese úrovně dospělých (Smith JB, Tabsh KMA. 1993). Existuje ale ještě jedna situace, kdy se exprese L-selektinu takto sníží a to při akutní bakteriální infekci. Vysvětlením je množství nezralých neutrofilů, které se vyplavují do krve a které mají sníženou expresi L-selektinu na svých površích. (Buhrer C et al. 1994)

U novorozeneckých neutrofilů se také po stimulaci chemoatraktantem snižuje podíl filamentózního aktinu oproti dospělým, i když basální hladina F-aktinu je srovnatelná (Harris MC et al. 1992). Klesá i výskyt guanosine triphosphate-binding proteinu (Rac2 – GTPáza regulující chemotaxi, fagocytózu, produkci superoxidu a baktericidní aktivitu neutrofilů) na povrchu neutrofilů. (Meade VM et al. 2006). Snižovaný výskyt Rac2 spolu s nižším zastoupením F-aktinu vede k horší schopnosti chemotaxe a migrace, což spolu s redukovanou expresí L-selektinu znesnadňuje shromažďování v místech infekce. Jiná práce ale tvrdí, že snížená je i basální hladina F-aktinu v neutrofilech u novorozenců (Hilmo A, Howard TH. 1987), ti

vysvětlují problémy s mobilitou menším množstvím aktivovatelného aktinu. Problémy s chemotaxí by mohly být vysvětleny sníženou rigiditou membrány u novorozenců, která tedy nenese receptory nutné pro navázání atraktantů (Wolach B et al. 1992). Normální stav se ustavuje během 10 dnů života, kdy dojde ke snížení fluidity pomocí cholesterolu.

Do stejné vývojové linie jako neutrofilů patří také eosinofily, které se uplatňují při infekcích mnohobuněčným parazitem (helminthozami apod) a bazofily, které se sekrečním způsobem uplatňují při likvidaci parazitů. Eosinofily vykazují sice podobnost s neutrofilů, u novorozenců se ale v mnoha aspektech liší. U novorozenců se vyskytuje osmkrát větší počet eosinofilů než u dospělých jedinců, jejich citlivost na chemoatraktanty je srovnatelná s dospělými jedinci a exprese receptoru fMLP (chemoatraktant Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine), který váže specifické struktury na bakteriálních povrchích, je také zvýšená, ačkoliv u neutrofilů izolovaných z pupečnickové krve vykazují stejné hodnoty exprese jako u dospělých. (Moshfegh A et al. 2005) Shodně s neonatálními neutrofilů mají eosinofily novorozenců sníženou povrchovou expresi L-selektinu (Smith JB, Tabsh KMA. 1993). Výše uvedené se přisuzuje dosud neznámé roli eosinofilů u novorozenců a je předmětem dalšího výzkumu. Jednou z hypotéz je, že neonatální eosinofily hrají roli v osidlování intestinálního traktu mikroorganismy. U bazofilů, které reagují na exogenní antigeny (antigeny vnějšího prostředí), nebyla v souvislosti s novorozenci popsána žádná odlišnost a nebyl ani prokázán vliv počtu bazofilů v pupečnickové krvi, který se lišil u jednotlivých jedinců, na následném vzniku imunologické přecitlivělosti (Kepley CL et al. 1998).

## 2.2.2 Monocyty a makrofágy

Monocyty vznikají z hematopoetických kmenových buněk myeloidní linie a mohou se diferencovat na makrofágy. Jejich hlavní funkcí je profesionální antigenní prezentace. Monocyty novorozenců vykazují nižší produkci cytokinů a expresi kostimulačních molekul CD86 a CD40, která se nedá zvýšit ani po stimulaci aktivátory (CD40L, IFN-gama) (Han P et al. 2004). To ovlivňuje schopnost fagocytózy, jenž je u novorozenců nižší. Aktivita pinocytózy je srovnatelná s dospělými jedinci. (Sorg RV et al. 1999). Také možnost diferenciace na DC je snížena, jak ukazují morfologické znaky neonatálních mDC ve srovnání s mDC dospělých (Liu E et al. 2001). Ačkoliv samotný povrchový TLR monocytů novorozenců se stavbou neliší od

TLR dospělých, následná aktivace signálních kaskád (NF- $\kappa$ B, MAP-kináza) probíhá blíže neobjasněným alternativním způsobem (Yan SR et al. 2004).

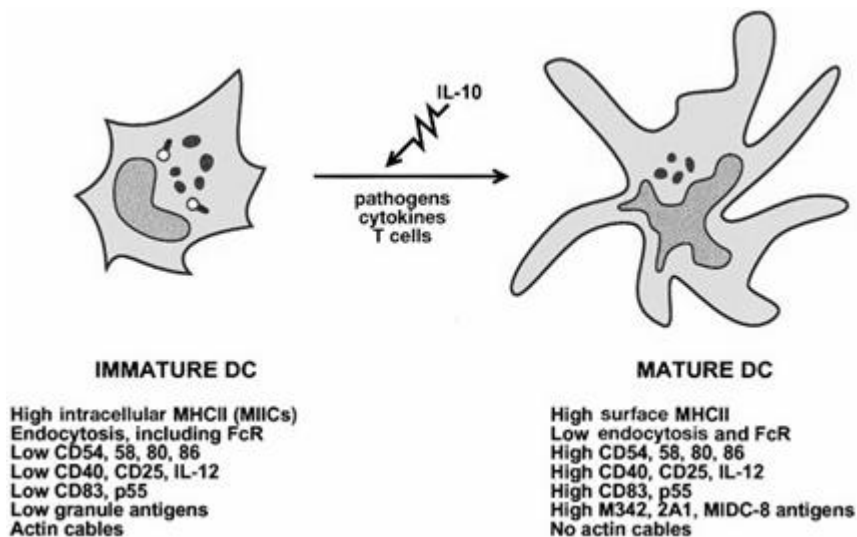
Neonatální makrofágy se vyznačují sníženou schopností reagovat na stimulaci IFN-gama, což souvisí s odlišnou fosforylací STAT-1 (Marodi L et al. 2001). Makrofágy novorozenců pak zabíjejí intracelulární parazity s mnohem nižší účinností (Marodi L et al. 2000).

### 2.2.3 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou nejdůležitějšími profesionálními antigen prezentujícími buňkami (APC) imunitního systému. Představují spojovací článek mezi přirozenou a adaptivní částí imunitního systému. U dospělých se v těle vyskytují ve dvou formách a to nezralé a zralé.

Nezralé DC pohlcují odumřelé buňky vlastních tkání a molekuly přítomné v mezibuněčné hmotě. Vyskytují se hlavně v kůži a sliznici dýchací a trávicí soustavy. Fragменты pohlcených částic jsou vystavovány v komplexech s MHC glykoproteiny na buněčném povrchu DC. Zde se pak setkávají s T lymfocyty.

Na povrchu DC se nacházejí specifické receptory TLR (toll like receptor), které rozpoznávají potenciálně nebezpečné antigeny. Po rozpoznání takového antigenu se DC do 48 hodin stává zralou. Ztrácí schopnost pohlcovat částice z okolí a migruje do lymfatických tkání. Na povrchu DC dochází ke zvýšení exprese MHC glykoproteinů, kostimulačních molekul a adhezivních molekul. Dále začíná produkovat značné množství cytokinů pro stimulaci a diferenciaci T lymfocytů – IL-1, IL-6, TNF, IL-12 apod. Toto vše přispívá k maturaci nezralých T lymfocytů, které potřebují primární kontakt MHC-TCR (první signál) a kostimulační CD28-CD80/CD86 (druhý signál). Cytokinové prostředí částečně ovlivňuje Th1/Th2 odpověď. Ve zralém stavu vydrží DC přibližně 2 – 3 dny, a poté apoptoticky hynou. (Satthaporn S, Eremin O. 2001)



Obrázek 1 Změny probíhající u DC během maturace. Nezralé DC pohlucují antigeny fagocytózou, makropinocytózou, pinocytózou. Příklad patogenu, který indukuje maturaci je lipopolysacharid (LPS), produkované cytokiny jsou např. TNF-alfa, GM-CSF, na DC CD40 se může vázat T buňka CD40L přítomným na svém povrchu. IL-10 inhibuje maturaci dendritických buněk. (převzato z Banchereau J, Steinman RM. 1998)

DC se dělí na dvě hlavní populace dle typu buněk, které stimulují. DC1 produkují IL-12 a působí na rozvoj Th1 odpovědi. DC2 sekretují IFN-alfa a beta a jsou důležité pro aktivaci Th2 odpovědi. (Zou G M, Tam YK. 2002)

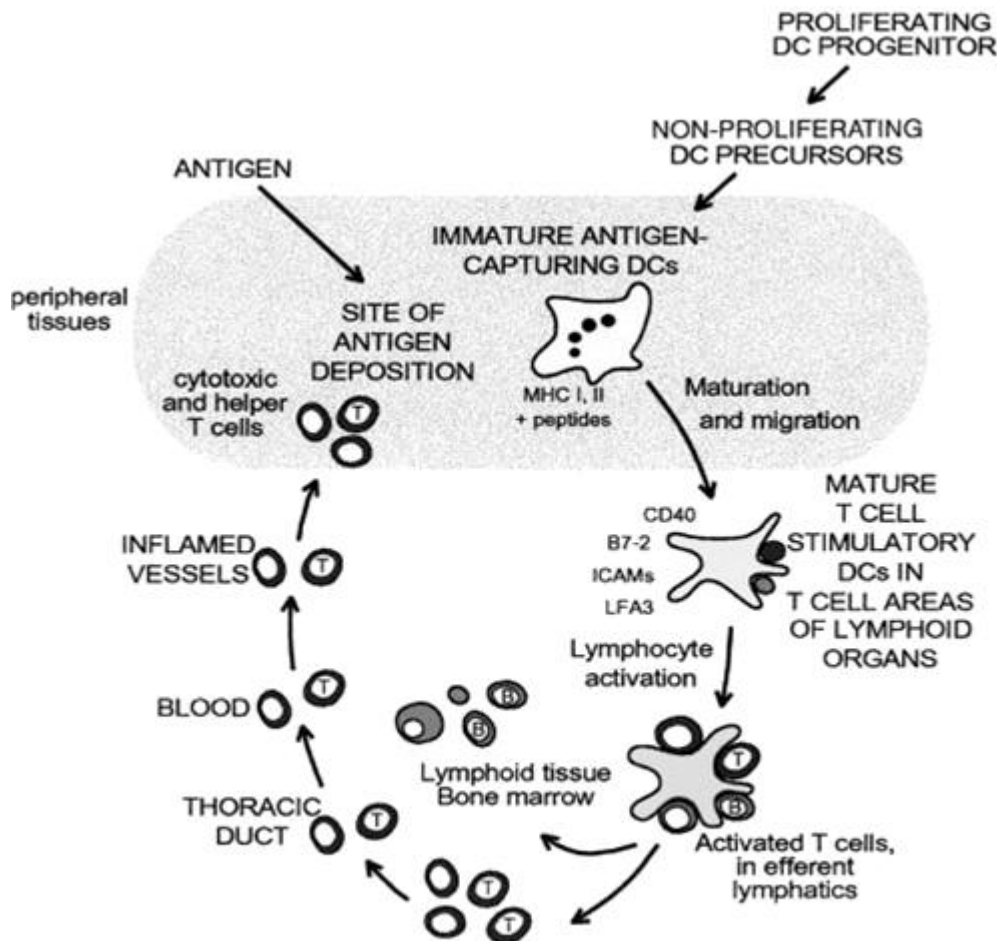
Další možnost, jak charakterizovat DC je podle prekurzorů, ze kterých pocházejí. Takto rozlišujeme mDC = myeloidní dendritické buňky (mDC = CD1), které pocházejí z hematopoetických kmenových buněk z linie monocytů a jsou stimulatory T lymfocytů. Na jejich povrchu se vyskytují hojně TLR = toll like receptory a hlavními stimulačními a diferenciačními faktory jsou IL-4 a GM-CSF. (Boonstra A et al. 2006)

Druhou skupinou jsou pDC = plazmacytoidní dendritické buňky (pDC = DC2), které mají funkci hlavně v protivirové obraně a stimulaci NK a NK-T buněk a pocházejí také hematopoetických kmenových buněk ovšem z linie lymfoidní. Produkují hlavně IFN-alfa a vyznačují se přítomností intracelulárních TLR-7 a TLR-9, což jsou receptory pro nukleové kyseliny. (McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. 2005)

Další skupinou jsou FDC = folikulární dendritické buňky, které mají nejasný původ, jisté je však, že nepocházejí z hematopoetické vývojové linie. Slouží hlavně pro afinitní maturaci B lymfocytů. Na svých površích jsou schopny skladovat imunokomplexy, které pak slouží k neustálé stimulaci B buněk a vzniku paměťových B buněk. (van Nierop K, de Groot C. 2002)

Dendritické buňky ale nestimulují pouze T lymfocyty, nýbrž i B buňky. Za určitých podmínek mohou být i B buňky APC, ale DC jsou mnohem účinnějšími APC. B buňky působící

jako APC mají více MHC II, produkují větší množství IL-12, internalizace antigenů probíhá pomocí Fc a multilektinových receptorů. B buňky mají na svém povrchu imunoglobulinové receptory (IgM, IgD) s příslušnou antigenní specifitou a inhibitory FcγRIIB (CD32B). Při aktivaci B buněk antigeny závislými na T buňkách, stimulují DC nejprve Th2. Aktivované Th2 exprimující CD40L jsou schopny efektivně působit na B lymfocyty přímým kontaktem nebo produkcí IL-10 a TGF-beta. (Banchereau J, Steinman RM. 1998)



Obrázek 2 Schéma působení DC na ostatní komponenty imunitního systému. Antigeny jsou pohlceny DC v tkáních a zpracovány do komplexu s MHC glykoproteiny. Následně jsou vystaveny na povrchu DC. Zralá dendritická buňka stimuluje T a B buňky v lymfatických tkáních. Aktivované B buňky se přesouvají do sliznice střeva, do kostní dřeně a do lymfatických orgánů, z některých se stávají plasmocyty sekretující protilátky. Aktivované T buňky se přesouvají do míst, kde se vyskytují APC a diferencují se do funkčně odlišných subpopulací – Tc, Th. (převzato z Banchereau J, Steinman RM. 1998)

Většina dendritických buněk je nepravidelného tvaru, někdy s obalem kolem buňky, se špatně viditelným jádrem a při pozorování se celé buňky natahují a smršťují, což jsou znaky shodné se znaky DC u dospělých (Hunt DWC et al. 1994).

U novorozenců mají DC nižší expresi HLA-ABC, HLA-DR a intracelulárního adhezivního ICAM-1 a CD54 (Hunt DWC et al. 1994).

Dendritické buňky z pupečnickové krve stimulují T buňky s mnohem menší efektivitou než dendritické buňky izolované z krve dospělého jedince. Jedním z důvodů může být i nižší přítomnost aktivačních molekul na povrchu DC novorozenců. (Hunt DWC et al. 1994, Wong OH, Huang FP, Chiang AKS. 2005)

Předchozí tvrzení je podpořeno tím, že dendritické buňky z pupečnickové krve preferují navození tolerance při pohlcení apoptotických nebo nekrotických buněk. Reagují až na závažné bakteriální infekce. Na rozdíl od DC z krve dospělého jedince, které při setkání s nekrotickou buňkou zvýší expresi kostimulačních molekul (CD80/86), aktivačních markerů (CD83), produkují zánětlivé i protizánětlivé cytokiny (TNF-alfa, IL-10) a stimulují aktivaci T lymfocytů, DC z pupečnickové krve novorozence po pohlcení apoptotické nebo nekrotické buňky minimálně zvýší tvorbu všech uvedených molekul a cytokinů. Srovnatelná je ale produkce TNF-alfa a IL-10 jako odpověď na lipopolysacharid, který je přítomen ve stěně gramnegativních bakterií; DC z krve dospělých produkují ve zvýšeném množství navíc ještě prozánětlivý IL-12, který novorozenecké DC produkují také, ale v téměř nedetekovatelném množství. (Wong OH et al. 2005, Goriely S et al. 2001).

Populace pDC a mDC v periferní krvi dospělých jedinců vykazují poměr 1:2, u novorozenců byl pozorován posun směrem k pDC a to 1:1 až dokonce 1:3. Převaha pDC, které se uplatňují v protivirové obraně, se vysvětluje jako důsledek stejného nepoměru u matky, který je ovlivněn hormony a speciálním cytokinovým prostředím potlačujícím rozvoj Th1 reakce. (Ueda Y et al. 2003)

V pupečnickové krvi byla nalezena nová subpopulace DC popsaná jako méně diferenciované dendritické buňky (ldDC = less differentiated DC). Tato subpopulace se vyskytuje i v periferní krvi dospělých, je ovšem téměř nedetekovatelná. ldDC v krvi novorozenců ukazuje na nevyzrálou imunitního systému a podporuje přítomnost nevyzrálých T lymfocytů s nižší expresí povrchových kostimulačních molekul. (Hagendorens MM et al. 2003)

Jak již bylo zmíněno dříve, všechny uvedené deficeience v novorozenecké krvi vedou k větší náchylnosti k infekcím a patogenům. Stejně tak omezená schopnost dendritických buněk aktivovat T lymfocyty a stimulovat jejich proliferaci.

## 2.2.4 NK buňky

Označení NK znamená natural killers = přirození zabíječi. Je to druh lymfocytů patřících do nespecifické části imunitního systému, protože nemají antigeně specifické receptory a buňky zabíjejí podle toho, zda mají na svém povrchu dostatečné množství MHC gp I molekul. Neprocházejí tedy diferenciací. Jejich nástroje jsou podobné Tc buňkám – perforiny, granzymy, Fas, lymfotoxin. Na svém povrchu mají dva typy receptorů. Jedny mají stimulační účinky a reagují na buňky opsonizované IgG protilátkami – to spustí cytotoxické mechanismy NK buněk – děj se nazývá na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity). Druhou skupinou jsou inhibiční receptory – jakmile receptor rozezná dostatečné množství MHC gp I na povrchu druhé buňky, utlumí aktivitu NK. Jejich aktivace je závislá na IL-12 a IFN-gama. Charakteristické molekuly na povrchu jsou CD16, CD56 a nepřítomnost CD3. (Biron ChA et al. 1999)

Ve srovnání s dospělými jedinci je počet NK buněk v krvi novorozenců lehce zvýšen (Theilgaard-Monch K et al. 2001). Oproti ostatním komponentům IS novorozenců NK buňky se vyznačují přítomností většiny maturovaných znaků pozorovaných u dospělých. Odlišným znakem od dospělých jedinců je snížená cytolytická aktivita novorozeneckých NK buněk. Ty na svém povrchu exprimují menší množství některých adhezivních a aktivačních molekul - L-selektin, ICAM-1 a CD161. Ovšem při kultivaci neonatálních NK buněk za vyšších koncentrací IL-12 a IL-15 typických pro normální krev se zvýšil podíl ICAM-1 i CD161 a s tím vzrostla i cytotoxická aktivita. Z toho lze vyvodit, že tento znak nezralosti souvisí s nižší hladinou výše zmíněných cytokinů, za které zodpovídá nezralost neonatálních monocytů. Ostatní znaky novorozeneckých NK buněk se shodovaly s těmi u dospělých. Exprese perforinu a granzymu B v buňkách pupečnickové krve byla dokonce vyšší než u krve dospělých jedinců. (Dalle JH et al. 2005)

## 3. Adaptivní imunitní mechanismy

Relativně evolučně mladé antigenně specifické imunitní mechanismy typické pro pokročilejší živočišné druhy počínaje obratlovci. K rozpoznání potenciálně nebezpečného patogenu využívají specifické receptory. Reakce na podnět se rozvíjí během několika dnů až týdnů a vzniká při ní imunologická paměť využitelná při další stejné infekci – zrychluje reaktivitu. Kooperují s přirozenou imunitou. Zařazují se sem buněčné složky – lymfocyty a humorální složky – protilátky.

### 3.1 T lymfocyty

T lymfocyty jsou specializované buňky s hlavní úlohou v antigenně specifické buněčně zprostředkované i protilátkové imunitě. Jejich primární funkce spočívá v likvidaci buněk infikovaných intracelulárními parazity a v stimulaci maturace B buněk.

Na povrchu každého T lymfocytu jsou receptory specifické pro tento typ buněk (TCR). Existují dva druhy. Jeden se skládá z podjednotek  $\alpha\beta$  a druhý z  $\gamma\delta$ . TCR s podjednotkami  $\alpha\beta$  je většinový. Vyvíjí se v thymu a rozeznává peptidy v komplexu s MHC glykoproteiny gp I nebo II. Druhý je menšinový, může se vyvíjet i mimo thymus, rozeznává nativní antigeny podobně jako B lymfocyty a některé jeho funkční vlastnosti jsou shodné s NK buňkami, takže se uvažuje, že by se mohl uplatňovat v boji proti některým specifickým typům patogenů.

Lymfocyty s TCR typu  $\alpha\beta$  se dělí dle typu koreceptoru na Th (přítomnost koreceptoru pro MHC třídy I -  $CD4^+$ ) a Tc (přítomnost koreceptoru pro MHC třídy II -  $CD8^+$ ).

Populace  $CD8^+$  zprostředkovává většinu cytotoxické aktivity proti virovým infekcím a nádorům. Cytotoxické T buňky Tc mají ale i důležité regulační funkce, protože produkují velké množství cytokinů. Jejich aktivace je způsobena setkáním s endoantigenem v komplexu s MHC glykoproteiny gp I. (Israels LG, Israels ED. 1999, Hořejší V, Bartůňková J. 2009)

$CD4^+$  buňkám se říká pomocné T lymfocyty Th. Jsou schopny aktivace makrofágů, B buněk a stimulace produkce protilátek. Pro aktivaci Th buněk je potřeba jejich kontakt s antigen prezentujícími buňkami APC, jako jsou například dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty. Ty na svém povrchu vystavují fragmenty pohlcených exoantigenů v komplexu s MHC gp II. Th buňky můžeme dělit dle spektra cytokinů, které tvoří na Th1 (IL-2, IFN-gama) (transkripční faktor T-bet) a Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13) (transkripční faktor GATA3). Další jsou ještě Th0 (směs Th1 a Th2 cytokinů), Th3 (TGF-beta), Tr1 (IL-10), Th17 (IL-17)



(transkripční faktor ROR $\gamma$ ), Tregs (IL-10, TGF-beta) (transkripční faktor FoxP3), Th9 (IL-9) (Veldhoen M et al. 2008), Th22 (IL-22) (Trifari S et al. 2009). (Sallusto F, Lanzavecchia A. 2009)

Existují ale i další populace T lymfocytů. Intraepiteliální lymfocyty, které jsou v kůži a sliznicích. Je to směs  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$  lymfocytů a jejich poměr je různý v každém orgánu. Jejich role je zejména v regulaci slizniční imunity a jako první ochrana proti patogenům z vnějšího prostředí. (Ferguson A. 1977) NK-T lymfocyty jsou typu  $\alpha\beta$ . Na jejich povrchu lze nalézt receptory podobné receptorům NK buněk. Tato skupina může exprimovat koreceptor CD4 nebo CD8, ale není to podmínkou. Rozznávají komplexy CD1d (podobné MHC gp I) s glykolipidy mikrobů nebo i vlastních buněk. Jejich funkce je pravděpodobně regulační. Produkuje velkou škálu cytokinů např. IFN-gama nebo IL-4. (Emoto M, Kaufmann SH. 2003.)

Důležitou skupinou T lymfocytů jsou regulační T buňky Treg, které mají schopnost potlačit účinky efektorových T lymfocytů. Při charakterizaci se označují za CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> s transkripčním faktorem FoxP3. Mezi tuto skupinu se zařazuje několik různých populací T lymfocytů se společnou funkcí. Nejvíce známé jsou ty CD4<sup>+</sup>, které nesou autoreaktivní TCR (minoritní), ale nenapadají vlastní tkáň, naopak potlačují autoimunitní reakce. Působí pomocí tlumivých cytokinů (IL-10, TGF-beta) a přímým kontaktem (CTLA-4) sekrecí perforinu a granzymů. Regulační buňky ale existují i v subpopulaci CD8<sup>+</sup> a další vznikají při setkání naivního T lymfocytu s DC prezentující autoantigen a při antigeně specifických reakcích v periferních tkáních, kde tlumí účinky Th1 či Th2 a omezují škodlivé imunopatologické dopady. Za další typy regulačních buněk se označují Tr1 a Th3. Regulační T lymfocyty mají ještě jednu unikátní schopnost, které se říká infekční tolerance. Umí totiž přeměňovat jiné T lymfocyty na sobě podobné buňky, pokud se například setkají na povrchu stejné dendritické buňky. (Velilla PA, Rugeless MT, Choungnet CA. 2006)

Každý typ T lymfocytů má vlastní způsob, kterým je zapojen do imunitního systému. Jednotlivé typy imunitních reakcí se vzájemně ovlivňují.

Th1 imunitní reakce je také nazývána zánětlivou. Je to kooperace mezi makrofágy a Th1 buňkami, které jejich aktivaci podněťují. Po pochlčení patogenu makrofágem dojde k vystavení fragmentu antigenní částice v komplexu s MHC třídy II na povrchu makrofágu. Tento komplex je rozpoznán TCR s příslušnou specifitou v komplexu s kostimulačním receptorem CD28, který se váže s CD86(CD80) na povrchu makrofágu. Pevného spojení obou

buněk se účastní ještě řada adhezivních molekul jako například ICAM-1 na makrofágu a LFA-1 na Th. Makrofágy ještě navíc sekretují IL-12, který stimuluje T lymfocyty k diferenciaci na Th1. Th1 lymfocyt okamžitě začne produkovat IFN-gama, který aktivuje makrofág a IL-2, což je autokrinní růstový faktor lymfocytů. Aktivovaný makrofág mnohem lépe likviduje intracelulární parazity a sekretuje řadu dalších cytokinů potlačujících infekci. Th1 odpověď je hlavně proti intracelulárním parazitům. (Fernandez-Botran R et al. 1988)

Imunitní reakce typu Th2 je založena na stimulaci diferenciaci B lymfocytů. Předpoklad je stejný jako u Th1. T lymfocyt se setká s APC a naváže se na její povrch pomocí všech zmíněných mechanismů. Pro rozvoj Th2 je ale nutná přítomnost IL-4 a TSLP (thymic stromal lymphopoetin). Ten je exprimován zejména ve sliznicích, kde působí na DC tak, že indukují vývoj Th2 odpovědi. Hlavní kostimulační proteiny jsou CD80, CD86. Zralé efektorové Th2 poskytují B lymfocytům nutné pomocné signály pro jejich maturaci prostřednictvím cytokinů ať už sekretovaných (IL-4, IL-5, IL-6) či membránově vázaných (CD40L). Tento druh odpovědi je založený zejména proti extracelulárním parazitům. (Israels LG, Israels ED. 1999)

Jak je patrné, tyto dva hlavní druhy imunitní odpovědi si v mnoha ohledech konkurují. Výběr té správné se ukázal jako nezbytný pro další vývoj situace a pro úspěšné zvládnutí infekce. Výběr záleží na poměru IL-12 a IL-4. Jakmile je upřednostněn jeden typ odpovědi, jeho produkty působí antagonisticky na ten druhý. Protože ale IL-2, který produkují Th1 buňky, působí i na Th2 jako růstový faktor, u většiny imunitních reakcí jsou přítomny oba druhy Th lymfocytů, i když jeden je v nadbytku. (Mackay CR. 2000)

Tc buňky chrání organismus před viry či intracelulárními parazity nebo likvidují poškozené či nádorové buňky. Jejich aktivace je závislá na kontaktu s makrofágem či dendritickou buňkou, která na svém povrchu prezentuje potenciálně nebezpečný antigen v komplexu s MHC gp I. Pro vazbu jsou potřeba ty samé kostimulační a adhezivní molekuly jako v předchozích případech. APC, který se dostane do kontaktu s prekurzorem T lymfocytu, ale potřebuje ještě aktivaci od Th lymfocytu, protože právě pak se na jeho povrchu objeví dostatečné množství kostimulačních molekul a i produkce IL-2 pomáhá T lymfocytům v maturaci. Jakmile jednou dojde k diferenciaci na Tc buňku, k rozeznání další APC jí už pak stačí kontakt přes TCR. K likvidaci používají Tc tři mechanismy: degranulaci perforinu a granzymů ( perforin vytvoří v membráně póry, kterými mohou projít granzymy, jenž štěpí prekurzory proteáz kaspázového cyklu a ten vede k apoptóze), Fas-ligand na svém povrchu

(apoptotický receptor) a sekreci cytokinu lymfotoxinu, který též vede k apoptóze. (Stinchcombe JC, Griffiths GM. 2007)

T lymfocyty izolované z pupečnickové krve vykazují mnohem menší schopnost reagovat na nízké dávky stimulatorů (lektinů: ConA nebo PHA), které se jsou polyklonální aktivátory vážící na TCR v komplexu s CD3 a proliferovat v odpovědi na anti-CD3 monoklonální protilátky. Zároveň také po aktivaci produkují pouze IL-2, ale už ne IFN-gama a IL-4 a ani netranskribují takové množství mRNA pro IL-3, IL-5, IL-6, GM-CSF jako u dospělých. Při vyšších dávkách mitogenů ale T lymfocyty proliferují již stejně intenzivně jako ty z krve dospělého jedince. Toto bývá vysvětlováno silnější interakcí T lymfocytů s DC přes lektinové domény. Zároveň bylo zjištěno, že hustota CD3 na povrchu T lymfocytů novorozenců je srovnatelná s hustotou na povrchu T lymfocytů dospělých. (Hunt DWC et al. 1994) Toto je ale v rozporu z dřívější studií, která prezentuje sníženou expresi CD3 na povrchu neonatálních T lymfocytů stejně jako primární produkci GM-CSF mRNA. Snížený výskyt CD3 na povrchu T lymfocytů se vysvětluje možnou přítomností ne zcela diferencovaných T lymfocytů v krvi novorozenců, které se již v krvi dospělých nevyskytují nebo tím, že T lymfocyty se sníženou expresí CD3 nejsou ještě plně funkční (Harris DT et al. 1992). Jiná práce uvádí zvýšené množství T buněk v krvi novorozence obecně, shodný poměr CD4+/CD8+ a počet CD3+ buněk dokonce zvýšený oproti krvi dospěléce. V této práci je rovněž popisován zvýšený počet naivních CD45RA v neonatální krvi. (D'Areña G et al. 1998) Tyto naivní CD45RA ale mohou být stimulací přeměněny na CD45RO stejně jako u dospělých (Chipeta J et al. 2000).

Většina T buněk přítomných v krvi novorozenců má TCR typu  $\alpha\beta$ , lymfocytů s TCR  $\gamma\delta$  je srovnatelné množství s krví dospělých a to asi 1-3 %. T lymfocyty v pupečnickové krvi vykazují v mnohem větší míře naivní fenotyp daný přítomností CD45RA na jejich povrchu. Také i celkové počty CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk jsou ve srovnání s dospělými nižší a poměr CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> je posunut ve prospěch CD4<sup>+</sup> lymfocytů. Pupečnicková krev novorozenců obsahuje navíc ještě populace lymfocytů, které se v krvi dospělých vůbec nevyskytují. Jsou jimi CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> a CD3<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> buňky (Harris DT et al. 1992), které jsou považovány za hematopoetické prekurzory T lymfocytů. Po stimulaci pupečnickové krve IL-2 vznikají buňky s vyšší cytotoxickou aktivitou ve srovnání s krví dospělých jedinců. Zvýšená cytotoxická aktivita je připisována NK-T buňkám. Tento typ se ale v krvi dospělých jedinců stimulované IL-2 nevyskytuje (Harris DT et al. 1992).

V krvi novorozenců jsou zastoupeny oba druhy Th buněk – Th1 i Th2. U myši se zjistilo, že na povrchu Th1 je exprimováno velké množství receptorů pro IL-13 (IL-13R $\alpha$ 1), které

heterodimerizují s IL-4R $\alpha$ . Když dochází k setkání s antigenem, Th2 buňky začnou produkovat IL-4, který je spouštěčem apoptózy u Th1. Toto způsobuje převahu Th2 v krvi novorozenců. K vyrovnaní dochází 6. den po narození, kdy už jsou DC schopny produkovat IL-12, což snižuje počet IL-13R $\alpha$ 1 na povrchu Th1, takže je to chrání proti apoptotickému signálu od Th2. Tento mechanismus zatím zůstává u lidí nepotvrzen. (Lee HH et al. 2008)

Rovnováha Th1 x Th2 je u novorozenců narušena a posunuta na stranu Th2 reakce. Jako příčina se ukazuje transplacentární kontakt mateřského a fetálního imunitního systému. Imunitní systém matky je hormony (progesteron, prostaglandin E2) a cytokinovým prostředím (IL-4, IL-10) nasměrován směrem k Th2 odpovědi tolerující přítomnost plodu a potlačení Th1. Tato disbalance se v novorozenci udržuje díky nezralosti antigen prezentujícího systému. Vyrovnaní se stimuluje očkováním v raném věku, které podpoří imunitní systém v rozvoji Th1 odpovědi. (Wegmann TG et al. 1993)

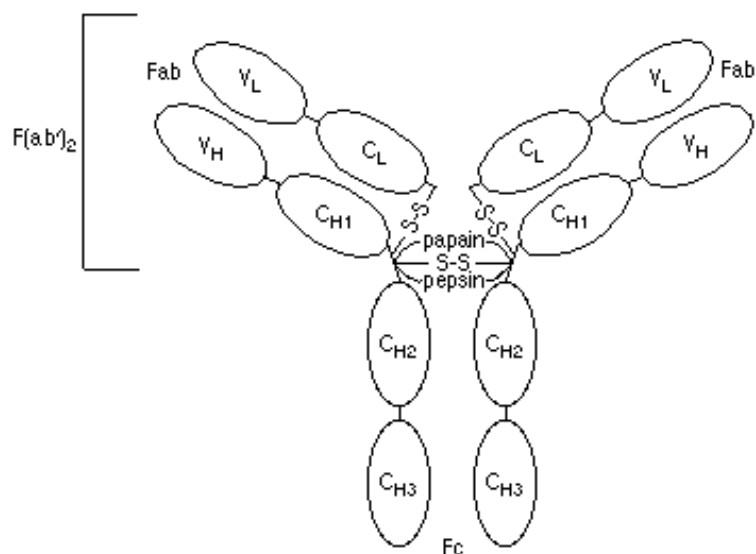
Jak již bylo zmíněno výše, T lymfocyty novorozenců mají sníženou schopnost proliferovat a produkovat cytokiny pod vlivem stimulantů. Jistý podíl na tom mají i Tregy přítomné v pupečnickové krvi. Ty totiž působí imunosupresivně na T lymfocyty. Mechanismus působení není ještě zcela objasněn, ale nejpravděpodobnější se jeví produkce tlumivých cytokinů (IL-10, TGF-beta) a působení přímým kontaktem za pomoci sekrece perforinu a granzymů stejně jako u dospělých. (Velilla PA, Rugeless MT, Chougnet CA. 2006)

Většina prací se shoduje na nižší reaktivitě novorozeneckých T buněk, jedna ale tvrdí, že při správné stimulaci dokážou T lymfocyty všech subpopulací reagovat stejně jako u dospělých jedinců (Chipeta J et al. 2000).

### 3.2 B lymfocyty a humorální část adaptivní imunity

Humorální větev antigen specifické části imunitního systému je reprezentována B buňkami. Stejně jako T lymfocyty pocházejí z hematopoetických kmenových buněk (HSC, CD34) z linie lymfoidních progenitorů. Hlavní funkcí diferencovaných B buněk je produkce protilátek - receptory se specifickým vazebným místem pro daný antigen. Protilátky mají tři důležitých funkce - neutralizace, opsonizace, eliminace. Toxiny a mikroorganismy s navázanými protilátkami jsou snadněji rozpoznávány příslušnými receptory fagocytů a NK-T lymfocytů. Protilátky navázané na povrchích mikroorganismů jsou schopny aktivovat komplement (klasickou cestou). Na povrchu B lymfocytů jsou podobně jako je to u T buněk

B receptory BCR ke zprostředkování kontaktu s antigeny. Strukturou se BCR shodují se sekretovanými imunoglobuliny, tedy protilátkami. BCR je ale ještě navíc doplněn o asociované signální molekuly, které pomáhají aktivovat signálních dráhy uvnitř buňky. Jako povrchové receptory B buněk slouží hlavně imunoglobuliny třídy IgM a IgD. Na povrchu se ještě vyskytuje komplementový receptor CR2, který je schopen se vázat na opsonizované povrchy. Spolupráce těchto dvou receptorů vede ke zvýšení účinnosti sekrece protilátek. (Parsons RF et al. 2009)



Obrázek 3: Strukturní prvky molekuly IgG (převzato z Andrew SM, Titus JA. 2003)

Protilátek existuje několik typů. Co mají ale shodné, je strukturní jednotka skládající se z těžkého H a lehkého L řetězce, které jsou navzájem i propojeny a stabilizovány cystinovými můstky. Místo propojení těžkých řetězců cystinovými můstky se nazývá pantová oblast. N konec části obou řetězců je variabilní oblast V, zbytek molekuly představuje konstantní oblast C. Variabilní domény formují vazebné místo pro antigen, a proto se jejich struktury mírně liší. Tato molekula může být ještě štěpena na menší fragmenty Fab, které obsahují jedno vazebné místo pro antigen a Fc. Fc je část imunoglobulinu po odštěpení Fab. Fc se může vázat na komplementový protein C1 a nebo na Fc receptory na povrchu fagocytů, takže může sloužit také jako opsonin (opsonin je protilátka, C3b, ...). Imunoglobuliny jsou jako většina sekretovaných proteinů glykosylovány a to v Fc části. (Spiegelberg HL. 1974)

Základních tříd protilátek je pět: IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Odlišují se strukturou těžkých řetězců, kterých existuje několik různých izotypů, jejichž geny jsou uspořádány sériově za sebou na jednom chromosomu. Nazývají se  $\epsilon$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\mu$ . Pak ještě existují subtypy řetězců a

to  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  a  $\gamma_1 - \gamma_4$  lišící se počtem cysteinových můstků v pantové oblasti a drobnými odlišnostmi ve struktuře. Podle tohoto rozdělení se jmenují i jednotlivé třídy. Lehké řetězce mohou být buď typu  $\lambda$  nebo  $\kappa$ , které se navzájem liší primární strukturou a jejich geny jsou umístěny na odlišných chromosomech, ale v podstatě jsou si ve všech ohledech velmi podobné. (Israels LG, Israels ED. 1999, Hořejší V, Bartůňková J. 2009)

IgM je třídou protilátek přítomnou na buněčném povrchu nezralého B lymfocytu. V sekretované formě tvoří pentamery spojené J řetězcem s deseti vazebnými místy pro antigen. Přispívá k primární protiinfekční obraně, ale není tvořen paměťovými buňkami. Po rozpoznání antigenu dobře váže komplementový protein C1 a aktivuje klasickou dráhu komplementu, neváže však Fc receptory fagocytů.

Monomerní IgD na povrchu buněk tvoří BCR stejně jako IgM.

IgG se vyskytuje v krvi nejčastěji. Jednotlivé druhy patogenů stimulují proliferaci různých podtříd IgG. Bakteriální polysacharidy indukují sekreci IgG2 a IgG4, virové patogeny pak IgG1 a IgG3. K jeho produkci musí dojít ke kontaktu B buňky s T lymfocylem. Vyskytuje se tedy až v pozdějších fázích infekce, není primární produkovanou protilátkou.

Skupina IgA se sestává ze slizničních IgA a sérových IgA. Slizniční IgA hraje roli v slizniční imunitě, kde zasahuje proti mikroorganismům. Slizniční IgA je přítomen v dimerní formě s J řetězcem spojujícím oba monomery a obsahující ještě navíc oproti všem ostatním třídám Ig sekreční komponentu SC, která má úlohu v slizniční imunitě - brání degradaci sIgA před protézami přítomnými ve střevním lumen, SC je zainkorporována do IgA při transcytóze, SC tvoří část receptoru pro polymerní Ig. Sérové jsou pak monomery, dimery nebo trimery spojené J řetězcem. IgA neumí aktivovat komplement – ve střevě tedy nemůže vzniknout zánět, výborně ale fungují jako opsoniny. IgA1 je produkována zejména ve sliznicích a IgA2 v kostní dřeni.

IgE se ve zvýšených koncentracích vyskytuje hlavně při alergiích a parazitálních onemocněních. Vazbou IgE k receptorům na povrchu žírných buněk a bazofilů dochází k jejich degranulaci, což je příčinou mimo jiné alergické reakce.

K produkci protilátek B lymfocyty dochází dvěma způsoby a to buď mechanismem závislým na T lymfocytech nebo nezávislým. V případě, kdy je sekrece protilátek nezávislá na pomoci T lymfocytů, dochází ke stimulaci buď pomocí bakteriálního lipopolysacharidu, který se váže na příslušný receptor a působí tedy jako polyklonální aktivátor B lymfocytů, a nebo mohou nespecifickou produkci protilátek stimulovat polymery např. povrchové

polysacharidy mikroorganismů nebo bičíky bakterií. Tento druhý typ antigenů nezávislých na T lymfocytech působí na receptory na povrchu B buněk tak, že jich aktivuje velké množství najednou, a tím je shlukuje. Tím dochází k diferenciaci na plazmatické buňky a produkci protilátek. Sekretované protilátky jsou pouze typu IgM. Tento typ sice nepotřebuje přímý kontakt s T lymfocyty, ale k diferenciaci je nutné cytokinové prostředí (IL-2, IL-4, IFN-gama), které zajišťují právě T buňky nebo NK buňky. Tato stimulace nezávislá na lymfocytech je navíc podmíněna zralostí ovlivňovaného B lymfocytu, takže u novorozenců nepřichází v úvahu. (Schelonka RL, Infante AJ. 1998)

Druhý způsob produkce protilátek je komplikovaným několikastupňovým systémem, který má za úkol vytvořit vysokoafinní imunoglobuliny a paměťové buňky. Prvním krokem je setkání antigenu s BCR a s APC. Při kontaktu s BCR se antigen naváže na jeho povrch, APC ho pohltí a vystaví v komplexu s MHC gp II na svém povrchu, což slouží jako aktivátor pro T lymfocyty, ze kterých vznikají diferenciované Th2 buňky. Th2 buňky se pak váží k B lymfocytům s navázanými antigeny a stimulují jejich proliferaci a přeměnu na plazmatické a paměťové buňky. V této fázi trvající zhruba 3-4 dny od setkání s antigenem plazmatické buňky produkují výhradně IgM, které působí proti šíření infekce. IgM je označováno jako přirozená protilátka. IgM se váží na antigeny za vzniku imunokomplexů, které jsou zachycovány na povrchu folikulárních dendritických buněk FDC v sekundárních lymfoidních orgánech. FDC pak slouží jako buňky prezentující antigen B lymfocytům. Druhá fáze začíná po kontaktu B buněk s FDC a pomocnými signály od Th. Kontakt mezi Th a B lymfocytem je zprostředkován receptorem CD40 na povrchu B buněk a CD40L na Th a je nepostradatelný pro všechny reakce sekundární fáze. Následně dochází k eliminaci klonů s nízkou afinitou BCR a vznikají vysokoafinní protilátky. V této fázi dochází k záměnám konstantních částí protilátek a tak ke vzniku i ostatních tříd. Tomuto procesu se říká izotypový přesmyk. Cytokinové prostředí ovlivňuje vznik jednotlivých izotypů protilátek. Pod vlivem IL-4 vznikají IgG a IgE, v přítomnosti TGF-beta a IL-10 IgA. (Miyajima A et al. 1988)

V průběhu těhotenství dochází k transplacentárnímu přenosu IgG. U novorozence pak koncentrace IgG1 dokonce převyšuje koncentraci matky, IgG2 je zpravidla nižší a IgG3 s IgG4 dosahují podobných koncentrací jako v séru matky (Malek et al., 1994). Pasivně získaný IgG přetrvává v krvi novorozence 20 dní, pak je metabolizován (Schelonka RL et al. 1994). Novorozenci začínají svůj vlastní IgG produkovat po narození, úrovně IgG dospělých jedinců dosahují až ve 3 letech věku (Saji F et al. 1999).

Produkce IgG, IgA a IgE neonatálními B lymfocyty je velmi nízká, úrovně dospělých dosahují teprve až několik měsíců či dokonce let po narození – v případě IgA může dojít k dosažení úrovně tvorby dospělými jedinci až v období puberty (Tucci A et al. 1991). Při podrobnějším hledání důvodů bylo zjištěno, že T lymfocyty, které pomáhají B buňkám v diferenciaci, v pupečnickové krvi neexprimují CD40L, který je nutný pro mezibuněčný kontakt s B lymfocyty (Durandy A et al. 1995). To se sice ukázalo jako pravdivý fakt, nicméně neonatální B buňky téměř neprodukovaly IgG, IgA a IgE ani při zajištění dostatečné stimulace a vhodného cytokinového prostředí (Durandy A et al. 1995).

Ještě je dobré zmínit, že ve srovnání s T lymfocyty, je počet B buněk srovnatelný s dospělými jedinci (Harris DT et al. 1992).

## 4. Cytokiny

Regulační molekuly imunitního systému produkované leukocyty a dalšími buňkami. Mohou působit autokrinně – na buňku, která je sekretuje, parakrinně – na buňky v těsné blízkosti, endokrinně – po transportu krevním řečištěm na vzdálené tkáně. Jsou ve velké míře pleiotropní – ovlivňují různé druhy buněk a často je jejich aktivace kaskádovitá. Nejdůležitější jsou IL-2 – autokrinní růstový faktor T, NK a B buněk, IFN-gama – aktivátor makrofágů, stimulant exprese MHC gp II produkovaný NK a Th1 buňkami, TNF-alfa – prozánětlivý cytokin monocytů, makrofágů a NK buněk, IL-4 – stimulant B buněk typický pro Th2, působí inhibičně na Th1 a makrofágy, IL-10 – podobně jako IL-4, IL-12 – stimulace Th1 a NK. (Paul WE, Seder RA. 1994)

U novorozenců byla prokázána snížená exprese IL-2, IFN-gama, TNF-alfa, IL-4, IL-10 a IL-12 v T buňkách (Hoffmann F et al. 2005). Vysvětluje se převahou neaktivovaných naivních CD45RA T buněk, které tyto cytokiny neprodukují na rozdíl od aktivovaných CD45RO většinových u dospělých jedinců (Ginaldi L et al. 2001). To zdůvodňuje i pozorovanou pozitivní korelaci mezi věkem jedince a hladinou cytokinů (Hoffmann F et al. 2005). V rozporu s touto studií je zjištění, že produkce IL-2 s věkem klesá, IL-4 a TGF-beta vykazují stabilně nízkou hladinu a IFN-gama, TNF-alfa s věkem roste (Wiegering V et al. 2009). Nízká sekrece IFN-gama může být důsledkem omezené Th1 odpovědi u novorozenců, což může být považováno za příčinu snížené koncentrace cytokinů typických pro Th1 typ imunitní odpovědi organismu (Wegmann TG et al. 1993).



Sníženou koncentraci IL-12 v pupečnickové krvi zapříčiňuje nízká produkce IL-12 neonatálními DC. IL-23, který spolu s IL-12 patří mezi heterodimerní cytokiny, exprimují novorozenecké buňky ve stejném nebo vyšším množství než u dospělých. IL-23 stimuluje CD8<sup>+</sup> T buňky k diferenciaci v Th17. Podporuje tvorbu IFN-gama, který působí jak na CD8<sup>+</sup> tak na CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. CD4<sup>+</sup> lymfocyty se pod vlivem IFN diferencují na Th1 buňky. IL-23 proto u novorozenců kompenzuje nižší produkci IL-12. (Eijnden SV et al. 2006)

## 5. Slizniční imunita

Do slizničního systému patří sliznice nosní, ústní, dýchací soustava, trávicí a urogenitální trakt; navíc ještě sliznice oka, vnitřního ucha, vývod exokrinních žláz včetně mléčné žlázy. Pronikání antigenů zabraňují i jiné mechanismy než imunitní (pohyb řasinek, proudění vzduchu a tekutin, sekrety s mikrobicidními účinky). Slizniční imunitní systém tvoří hlavně mukózní lymfatický systém MALT (mucous associated lymphoid tissue). Pro novorozence je důležitý hlavně GALT – slizniční systém střeva. (Hořejší V, Bartůňková J. 2009)

Slizniční imunitní systém je nezávislý na systémové imunitě. Vyznačuje přítomností speciálních subpopulací T lymfocytů – intraepiteliální – nezávislých na thymu, vyšším zastoupením  $\gamma\delta$  TCR, sIgA, M buňkami – vychytávání antigenů a jejich následný transport k APC.

U dospělých jedinců je střevní systém osídlen více jak 450 druhy mutualistických a komenzálních mikroorganismů (Eckburg PB et al. 2005). U kojených novorozenců je oproti dospělým jedincům pozorována predominance laktobacilů (*Bifidobacterium bifidum*) v mikroflóře střeva. Ty zvyšují pH v lumen střeva a brání tak intestinálním patogenům infikovat novorozence. (Newburg DS, Walker WA. 2007) Imunitním mechanismem uplatňujícím se v obraně proti nežádoucím patogenům a udržujícím střevní mikroflóru v rovnováze je v první řadě sekreční IgA - sIgA. Sekreční IgA se váže na mikroorganismy přítomné ve střevě a zabraňuje jim v adherenci na povrch sliznice. Škodlivé mikroorganismy a toxiny jsou v komplexu s IgA popřípadě IgM transportovány ven z organismu – mechanismem imunitní exkluze. Sekreční IgA neaktivuje komplement, což chrání epiteliální vrstvu – povrch střeva – před zánětlivým poškozením. U novorozenců je tento mechanismus do značné míry nefunkční vzhledem k neschopnosti neonatálních B buněk produkovat protilátky typu IgA. Částečně dochází ke kompenzaci sIgA z mateřského mléka.

Povrch střeva je chráněn silnou mucinovou vrstvou glykosylovaných proteinů, která vytváří glykokalyx (Frey A et al. 1996). Glykokalyx je pokryt biofilmem symbiotické mikrobiální flóry. Skladba mucinu a glykosylace intestinálního glykokalyxu se liší mezi dospělými a novorozenci, což může způsobovat rozdílné zastoupení mikroorganismů a větší náchylnost ke střevním patogenům (Robbe C et al. 2004). Tato vrstva je produkována pohárkovými buňkami, mezi kterými se nacházejí Panethovy buňky sekretující mikrobiální peptidy, lysozymy a další látky pomáhající udržet rovnováhu střevní mikroflóry. Panethovy buňky mají také za úkol stabilizovat antimikrobiální prostředí na bázi klků, které zvětšují povrch střeva, kde se nalézají i kmenové buňky obnovující epitelální buňky každých asi 5 dní. Součástí imunitního systému střeva jsou Peyerovy pláty – specializované oblasti folikulů B lymfocytů obklopených T lymfocyty. Mezi B lymfocyty se ještě vyskytují APC – FDC, DC a makrofágy. DC jsou schopné postupovat mezi enterocyty a svými výběžky fagocytovat antigeny přímo z lumen střeva. M-buňky kryjící oblasti Peyerových plátů umístěné mezi střevním epitelem pohlcují antigeny z intestinálního lumen a transcytózou je přenášejí k APC. APC s antigeny navázanými v komplexu s MHC následně stimulují T lymfocyty, které se vlivem cytokinového prostředí diferencují na Th2 a aktivují B lymfocyty nebo jsou luminální antigeny rozpoznávány přímo BCR specifickými pro daný antigen. Aktivované B lymfocyty jsou schopny tvořit IgA. Celá tato kaskáda reakcí funguje u novorozenců v omezené míře a je kompenzována IgA z mateřského mléka. (Newburg DS, Walker WA. 2007)

Mateřské mléko podporuje vyžívání neonatální slizniční imunity. Imunogenní molekuly přítomné v mateřském mléce procházejí snáze přes střevní epitel z důvodu nepřítomnosti těsných spojů mezi enterocyty. Těsné spoje jsou vytvořeny v průběhu 4 dnů po narození (Udall JN et al. 1981). Komponenty mateřského mléka dokážou aktivně potlačit nevhodné zánětlivé reakce během raných stádií života. IgA z mateřského mléka také rozhoduje o tom, které mikroorganismy osídlí lumen střeva novorozence a které budou považovány za potenciálně patogenní. V žaludku novorozence je mateřské mléko štěpeno na mastné kyseliny a monoglyceridy, které inhibují rozvoj virů, bakterií a protozoí. (Hamosh M. 1998)

## 6. Mateřské mléko

Primárním významem mateřského mléka je výživa a růst novorozence. Mateřské mléko ovšem neobsahuje jen živiny, vitaminy, minerály, stopové prvky, hormony, růstové faktory ale i imunologicky aktivní složky (jak buněčné tak nebuněčné povahy). Kojení je tedy pro novorozence zároveň důležitým zdrojem humorálních i celulárních složek imunitního systému, které zajišťují pasivní ochranu proti infekcím a mají též aktivní imunoregulační funkci. V dnešní době je diskutována otázka vlivu imunopatologického stavu matky na mléko a vývoj novorozence. (Jackson KM, Nazar AM. 2006)

Mateřské mléko obsahuje IgA (12 mgml<sup>-1</sup> kolostra), IgG (0,1 mgml<sup>-1</sup> kolostra), IgD a IgM (0,6 mgml<sup>-1</sup> kolostra) (Goldman AS, Goldblum RM. 1989). Koncentrace IgA postupně klesá až k 1 mgml<sup>-1</sup> (Goldblum RM et al. 1982). IgA v sekreční formě je nejvíce zastoupeným imunoglobulinem v kolostru. Jeho funkce je blíže popsána v kapitole slizniční imunita.

Dále jsou zde prokazatelně zastoupeny všechny složky komplementu (Nakajima S, Baba AS, Tamura N. 1977).

Cytokinů lze v mateřském mléce nalézt celou škálu. IFN-gama (Eglinton BA et al. 1994), IL-2 (Skansen SU et al. 1993), které jsou přítomny při Th1 odpovědi a IL-4, IL-13 (Srivastava MD et al. 1996, Rudloff S et al. 1999), IL-10 (Rudloff S et al. 1999, Garofalo R et al. 1995) náležící k reakci Th2. Navíc ještě IL-12 (Bryan DL et al. 1999) a IL-18 (Takahata Y et al. 2001) a TGF-beta (Donnet-Hughes A et al. 2000), dále IL-5, IL-6, IL-13 (Prokešová L et al. 2006).

V prvních dnech laktace je koncentrace leukocytů vysoká (1-3 \* 10<sup>6</sup>ml<sup>-1</sup>). Poměrně zastoupeny jsou neutrofilů z 80 %, makrofágů z 15 % a lymfocytů ze 4 % . (Smith CW, Goldman AS. 1968) Poměr T-lymfocytů k B-lymfocytům se udává 83 % : 6 % všech lymfocytů v mateřském mléce (Bertotto A et al. 1990). V populaci T lymfocytů se pak nacházejí CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> subpopulace ve vyrovnaném množství nebo CD8<sup>+</sup> lehce převažují. Lymfocyty mateřského mléka se vyznačují povrchovou expresí molekuly CD45RO, typické pro paměťové buňky. (Wirt DP et al. 1992) TCR v mateřském mléce odpovídá převážně typu αβ, ale zastoupení TCR typu γδ je několikanásobně vyšší než v periferní krvi dospělých (Reardon C et al. 1990).

## 7. Očkování

Novorozenci jsou podle všech ukazatelů náchylnější k infekcím než dospělí jedinci. Ke snížení úmrtí v raném věku se používá aktivní nebo pasivní imunizace. Vakcinace čili aktivní imunizace funguje na principu připravení organismu na případné setkání s infekcí. Při aktivní imunizaci je podána bezpečná dávka antigenu, která je schopná navodit příslušnou imunologickou odpověď – především Th2 typ buněčné odpovědi s následnou tvorbou protilátek. U novorozenců se uplatňuje většinou profylaktický přístup - vyhnout se možné infekci. Jako vakcíny mohou být použity: oslabené živé mikroorganismy (spalničky, příušnice, zarděnky, tuberkulóza, žlutá zimnice...), inaktivované mikroorganismy (difterie, tyfus, chřipka, klíšťová encefalitida, vzteklna...), izolované části vlastních mikroorganismů (hepatitida B, meningokok...) či produkty mikroorganismů – např. toxoidy (tetanus, difterie...). Při tomto způsobu očkování hrozí nebezpečí rozvoje onemocnění způsobeného příslušným agens přítomným ve vakcíně. Samozřejmě, že vždy hrozí riziko spuštění choroby, ale přínos tohoto očkování jej vyváží. Pasivní imunizace u novorozenců probíhá přirozeně přechodem protilátek přes placentu z krve matky. Pasivní imunizace dospělých se provádí naočkováním zvířecích protilátek se specifitou pro daný antigen. Antigenem jsou v tomto případě různé toxiny (hadí jed, tetanický toxin, botulotoxin...). Profylakticky se mohou podávat dávky lidských imunoglobulinů z imunizovaných jedinců v případech, kdy hrozí zvýšené riziko nákazy nebo u imunosuprimovaných pacientů. (Hořejší V, Bartůňková J. 2009)

Podobně jako v jiných evropských zemích se u nás provádí povinné a pravidelné očkování podle očkovacího kalendáře daného zákonem. Jedná se o očkování proti tuberkulóze (4.-6. týden), záškrtu, tetanu, dávivému kašli, proti bakterii *Haemophilus influenzae* typu b., přenosné dětské obrně, virové hepatitidě typu B (3.-4. měsíc), spalničkám, příušnicím a zarděnkám (15. měsíc).

Při očkování novorozenců existuje zvýšené riziko vzniku alergií nebo autoimunitních reakcí, neboť novorozenci netvoří kompletní škálu Ig a jejich imunitní systém se vyznačuje sklonem k výrazné Th2 buněčné odpovědi. (Goriely S, Goldman M. 2007). Dalším rizikem je selhání vakcíny jako takové, kdy k produkci protilátek vůbec nedochází, protože BCR B lymfocytů jsou obsazeny mateřskými protilátkami a podaná vakcína musí kompetovat o příslušná vazebná místa. Řešením je přiměřená dávka vakcíny. (Siegrist CA. 2003) Ke snížené schopnosti reagovat na některé vakcíny dále přispívá nepoměr mezi zastoupením Th1 a Th2

buněk u novorozenců v porovnání s dospělými jedinci. Například na očkování proti obrně podávané perorálně novorozenci reagují v porovnání mnohem menší produkcí IFN-gama, ačkoliv produkují dostatečné titry neutralizujících protilátek. (Vekemans J et al. 2002) Obecně lze říci, že novorozenecká imunita reaguje lépe na polysacharidové antigeny, které jsou eliminovány mechanismy, které nepotřebují přítomnost specifických klonů pomocných buněk (Th2), než na proteinové antigeny závislé na T lymfocytech, které stimulují produkci protilátek IgG a IgM, které ovšem v novorozenecké krvi setrvávají pouze krátkodobě ve srovnání s poklesem koncentrací u dospělých (Siegrist CA. 2007). Každá vakcína musí tedy projít přísnou kontrolou a testováním, než je použita v praxi.

V současné době se intenzivně pracuje na vývoji účinnějších způsobů očkování, které by pomohly novorozencům rozvinout imunitní systém a ochránily je před pro ně letálními infekcemi. Mezi testované hypotézy patří vnášení antigenu do cytoplasmy APC (Permer TM et al. 2000, Franchini M et al. 2001, Kollmann TR et al. 2007), DNA vakcíny (plazmidy s fragmenty kódující proteiny virů) (Pelizon AC et al. 2007, Sedegah M, Hoffman SL. 2006, Premenko-Lanier M et al. 2004), intranasální vakcíny živých atenuovaných mikroorganismů (Capozzo AV et al. 2004, Mielcarek N et al. 2006), použití nových adjuvancií k zlepšení antigenní prezentace dendritických buněk a jejich produkce cytokinů (Parkinson T. 2008, Ishii KJ, Akira S. 2007).

## 8. Závěr

Výrazným znakem odlišujícím IS novorozenců od IS dospělých lidí je zejména jeho nezralost vyznačující se nižší schopností reagovat na antigenní podněty vnějšího prostředí doprovázenou sníženou tvorbou protilátek. Nejvíce k ní přispívá nedostatečná funkce profesionálních antigen prezentujících buněk v novorozeneckém organismu, výrazná převaha Th2 odpovědi, která je dána růstem plodu v děloze a nutností tolerance imunitním systémem matky a neschopnost neonatálních B buněk produkovat protilátky. Potlačení Th1 reakce u novorozenců může mít následky i v dalším vývoji dítěte, protože dominance Th2 je v některých případech příčinou vzniku atopií a dalších vážných imunopatologií.

Náchylnost novorozenců k infekcím kompenzuje v první řadě mateřské mléko. Kojení představuje důmyslné propojení imunitního systému matky a kojence. Matka tvoří protilátky proti patogenům ve svém okolí. Vzniklé vysoce afinní protilátky IgA pak přes mléčnou žlázu

přecházejí do mléka a následně do střevního slizničního systému kojence. Protože se novorozenec vyskytuje ve stejném prostředí jako matka, je tudíž imunizován před mikroorganismy, které by ho mohly ohrozit.

Možností podpoření imunitního systému novorozence jinou cestou je očkování v raném věku. To ale naráží na mnohá úskalí zapříčiněná právě značnou odlišností neonatální imunity nejen od dospělých jedinců ale i od starších dětí. Pochopení rozdílů, které jsou uvedeny v této práci, by mohlo přispět k rozvoji účinnějších vakcín podávaných novorozencům.

## Seznam použité literatury

- Adamkin D, Stitzel A, Urmson J, Farnett MI, Post E, Spitzer R.** 1978. Activity of the alternative pathway of complement in the newborn infant. *J Pediatr* 93: 604-608
- Adinolfi M, Beck S.** 1976. Human complement C7 and C9 in fetal and newborn sera. *Arch Dis Child* 50: 562-564
- Adinolfi M.** 1977. Human complement. Onset and site of the synthesis during fetal life. *Am J Dis Child* 131: 1015-1023
- Anderson DC, Hughes BJ, Edwards MS, Buffone GJ, Baker CJ.** 1983. Impaired chemotaxis by type III group B streptococci in neonatal sera: relationship to diminished serum complement. *Pediatr Res* 17: 496-502
- Andrew SM, Titus JA.** 2003. Fragmentation of Immunoglobulin G. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 16: Unit 16.4
- Banchereau J, Steinman RM.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-52
- Berger M.** 1990. Complement deficiency and neutrophil dysfunction as risk factors for bacterial infection in newborns and the role of granulocyte transfusions in therapy. *Rev Infect Dis* 12: S401-S409
- Bertotto A, Gerli R, Fabietti G, Crupi S, Arcangeli C, Scalise F, Vaccaro R.** 1990. Human breast milk T lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory T cells. *Eur J Immunol* 20(8): 1877-1880
- Biron ChA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP.** 1999. NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu Rev Immunol* 17:189–220
- Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EEM, Akira S, Vieira P, Liu YJ, Trinchieri G, O'Garra A.** 2006. Macrophages and Myeloid Dendritic Cells, but Not Plasmacytoid Dendritic Cells, Produce IL-10 in Response to MyD88- and TRIF-Dependent TLR Signals, and TLR-Independent. *J Immunol* 177: 7551-7558
- Borzy MS, Gewruz A, Wolff L, Houghton D, Lovrien E.** 1988. Inherited C3 deficiency with recurrent infections and glomerulonephritis. *Am J Dis Child* 142: 79-83
- Bryan DL, Hawkes JS, Gibson RA.** 1999. Interleukin-12 in human milk. *Pediatr Res* 45(6): 858-859
- Buhrer C, Graulich J, Stibenz D, et al.** 1994. L-selectin is downregulated in umbilical cord blood granulocytes and monocytes of newborn infants with acute bacterial infection. *Pediatr Res* 36: 799-804
- Capozzo AV, Cuberos L, Levine MM, Pasetti MF.** 2004. Mucosally delivered Salmonella live vector vaccines elicit potent immune responses against a foreign antigen in neonatal mice born to naive and immune mothers. *Infect Immun* 72: 4637–4646
- Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M.** 2000. Neonatal (Cord Blood) T cells Can Competently Raise Type 1 and 2 Immune Responses upon Polyclonal Activation. *Cell Immunol* 205: 110-119

- Christensen RD, MacFarlane JL, Taylor NL, Hill HR, Rothstein G.** 1984. Blood and marrow neutrophils during experimental group B streptococcal infection. Quantification of the stem cell, proliferative, storage and circulating pools. *Pediatr Res* 16: 599-602,
- D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendoli F, Carotenuto M.** 1998. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haem* 83: 197-203
- Dalle JH, Menezes J, Wagner É, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, Duval M.** 2005. Characterization of Cord Blood Natural Killer Cells: Implications for Transplantation and Neonatal Infections. *Pediatr Res* 57(5): 649-655
- Donnet-Hughes A, Duc N, Serrant P, Vidal K, Schiffrin EJ.** 2000. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor-beta. *Immunol Cell Biol* 78(1): 74-79
- Durandy A, De Saint Basile G, Lisowska-Groszpiere B, Gauchat JF, Forveille M, Kroczek RA, Bonnefoy JY, Fischer A.** 1995. Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell respond to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol* 154: 1560-1568
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728): 1635-8
- Eglinton BA, Robertson DM, Cummins AG.** 1994. Phenotype of T cells, their soluble receptor levels, and cytokine profile of human breast milk. *Immunol Cell Biol* 72(4): 306-313
- Eijnden SV, Goriely S, De Wit D, Goldman M, Willems F.** 2006. Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. *Eur J Immunol* 36: 21-26
- Emoto M, Kaufmann SH.** 2003. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol* 24(7): 364-9
- Ferguson A.** 1977. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 18(11): 921-37
- Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES.** 1988. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 168(2): 543-58
- Franchini M, Abril C, Schwerdel C, Ruedl C, Ackermann M, Suter M.** 2001. Protective T-cell-based immunity induced in neonatal mice by a single replicative cycle of herpes simplex virus. *J Virol* 75: 83-89.
- Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, Neutra MR.** 1996. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 184: 1045-1059
- Garofalo R, Chheda S, Mei F, Palkowetz KH, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Rassin DK, Goldman AS.** 1995. Interleukin-10 in human milk. *Pediatr Res* 37(4 Pt 1): 444-449
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto F, Modesti M, Quaglino D.** 2001. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol* 67: 63-72



- Goldblum RM, Goldman AS, Garza C, Johnson CA, Nichols BL.** 1982. Human milk banking. II. Relative stability of immunologic factors in stored colostrum. *Acta Paediatr Scand* 71(1): 143-144
- Goldman AS, Goldblum RM.** Immunoglobulins in human milk. In: Atkinson SA, Lonnerdal B, eds. 1989. Protein and Non-Protein Nitrogen in Human Milk. Boca Raton, *CRC Press*
- Goriely S, Goldman M.** 2007. From tolerance to autoimmunity: is there a risk in early life vaccination? *J Comp Pathol* 137(1): S57-61
- Goriely S, Vincart B, Stordeur P, Vekemans J, Willems F, Goldman M, De Wit D.** 2001. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol* 166: 2141–2146
- Hagendorens MM, Ebo DG, Schuerwegh AJ, Huybrechs A, Van Bever HP, Bridts CH, De Clerck DS, Stevens VJ.** 2003. Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children. *Clin Exp Allergy* 33: 633-639
- Hamosh M.** 1998. Protective function of proteins and lipids in human milk. *Biol Neonate* 74: 163–176
- Han P, McDonald T, Hodge G.** 2004. Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway *Immunol* 113: 26-34
- Harris DT, Schumacher MJ, Locascio J, Besencon FJ, Olson GB, DeLuca D, Shenker L, Bard J, Boyse EA.** 1992. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10006-10010
- Harris MC, Shalit M, Southwick FS.** 1992. Diminished actin polymerization by neutrophils from newborn infants. *Pediatr Res* 33: 27-31
- Hilmo A, Howard TH.** 1987. F-actin content of neonate and adult neutrophils. *Blood* 69: 945-949
- Hoffmann F, Albert MH, Arenz S, Bidlingmaier C, Berkowicz N, Sedlaczek S, Till H, Pawlita I, Renner ED, Weiss M, Belohradsky BH.** 2005. Intracellular T-cell cytokine levels are age-dependent in healthy children and adults. *Eur Cytokine Netw* 16(4): 283-8
- Hořejší V, Bartůňková J.** 2009. Základy imunologie. *Triton*
- Hunt DWC, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE.** 1994. *Am Soc Hem* 84: 4333-4343
- Ishii KJ, Akira S.** 2007. Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. *J Clin Immunol* 27: 363–371
- Israels LG, Israels ED.** 1999. Lymphocytes. *Onc* 4: 129-137
- Jackson KM, Nazar AM.** 2006. Breastfeeding, the immune response, and long-term health. *J Am Osteopath Assoc* 106(4): 203-7
- Johnston RB, Altenburger KM, Atkinson AW, Curry RH.** 1979. Complement in the Newborn Infant. *Pediatrics* 64(5): 781-786
- Kepley CL, Pfeiffer JR, Schwartz LB, Wilson BS, Oliver JM.** 1998. The identification and characterization of umbilical cord blood-derived human basophils. *J Leukoc Biol* 64(4): 474-83

- Kohler PF.** 1973. Maturation of human complement – system. 1. Onset time and sites of fetal C-1Q, C-4, C-3, and C-5 synthesis. *J clinical investigation* 52: 671-677
- Kollmann TR, Reikie B, Blimkie D, Way SS, Hajjar AM, Arispe K, Shaulov A, Wilson CB.** 2007. Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* in neonates. *J Immunol* 178: 3695–3701
- Lannergård A, Friman G, Ewald U, Lind L, Larsson A.** 2005. Serum amyloid A (SAA) protein and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in healthy newborn infants and healthy young through elderly adults. *Acta Paediatr* 94(9): 1198-202
- Lee HH, Hoeman ChM, Hardaway JC, Guloglu FB, Ellis J, Jain R, Divekar R, Tartar DM, Haymaker CL, Zaghouni H.** 2008. Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity. *J Exp Med* 205(10): 2269-2280
- Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll S, Lee K, Goldmann D, and Thorne G.** 1999. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). *Pediatrics Res* 104: 1327-1333
- Liu E, Tu W, Law HK, Lau YL.** 2001. Decreased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. *Br J Haematol* 113: 240-246
- Mackay CR.** 2000. Follicular homing T helper (Th) cells and the Th1/Th2 paradigm. *J Exp Med* 192(11): F31-4
- Malek A, Sager R and Schneider H.** 1994. Maternal–fetal transport of immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 32(1): 8-14
- Marodi L, Goda K, Palicz A, Szabo G.** 2001. Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN-gamma. *Clin Exp Immunol* 126: 456-460
- Marodi L, Kaposzta R, Nemes E.** 2000. Survival of group B streptococcus type III in mononuclear phagocytes: differential regulation of bacterial killing in cord macrophages by human recombinant gamma interferon and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun* 68: 2167-2170
- McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N.** 2005. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *J Vir* 79(1): 17-27
- Meade VM, Barese CN, Kim C, Njinimbam CG, Marchal CC, Ingram DA, Clapp DW, Dinauer MC, Yoder MC.** 2006. Rac2 concentrations in umbilical cord neutrophils. *Biol of the neonate* 90: 156-159
- Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, Younes AB, Creusy C, Engle J, Goldman WE, Locht C.** 2006. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog* 2:e65
- Miyajima A, Miyatake S, Schreurs J, De Vries J, Arai N, Yokota T, Arai K.** 1988. Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T cell-derived lymphokines. *FASEB J* 2(9): 2462-73
- Moshfegh A, Lothian C, Hallden G, Marchini G, Lagercrantz H, Lundahl J.** 2005. Neonatal Eosinophils Possess Efficient Eotaxin/IL-5– and *N*-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine–Induced Transmigration *In Vitro*. *Pediatr Res* 58(1): 138-142

- Nakajima S, Baba AS, Tamura N.** 1977. Complement system in human colostrum: presence of nine complement components and factors of alternative pathway in human colostrum. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 54(5): 428-433
- Newburg DS, Walker WA.** 2007. Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of Human Milk. *Pediatr Res* 61(1): 2-8
- Parkinson T.** 2008. The future of toll-like receptor therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 10: 21–31
- Parsons RF, Vivek K, Redfield RR, Migone TS, Cancro MP, Naji A, Noorchashm H.** 2009. B-cell tolerance in transplantation: is repertoire remodeling the answer? *Expert Rev Clin Immunol* 5(6): 703
- Paul WE, Seder RA.** 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76(2): 241-51
- Pelizon AC, Martins DR, Zorzella SF, Trombone AP, Lorenzi JC, Carvalho RF, Brandao IT, Coelho-Castelo AA, Silva CL, Sartori A.** 2007. Genetic vaccine for tuberculosis (pVAXhsp65) primes neonate mice for a strong immune response at the adult stage. *Genet Vaccines Ther* 5:12
- Pertmer TM, Oran AE, Moser JM, Madorin CA, Robinson HL.** 2000. DNA vaccines for influenza virus: differential effects of maternal antibody on immune responses to hemagglutinin and nucleoprotein. *J Virol* 74: 7787–7793
- Premenko-Lanier M, Rota PA, Rhodes GH, Bellini WJ, McChesney MB.** 2004. Protection against challenge with measles virus (MV) in infant macaques by an MV DNA vaccine administered in the presence of neutralizing antibody. *J Infect Dis* 189: 2064–2071
- Prokešová L, Lodinová-Žádníková R, Žižka J, Kocourková I, Novotná O, Petrásková P, Šterzl I.** 2006. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* 17(3): 175-83
- Reardon C, Lefrancois L, Farr A, Kubo R, O'Brien R, Born W.** 1990. Expression of gamma/delta T cell receptors on lymphocytes from the lactating mammary gland. *J Exp Med* 172(4): 1263-1266
- Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC.** 2004. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem J* 384: 307–316
- Rudloff S, Niehues T, Rutsch M, Kunz C, Schroten H.** 1999. Inflammation markers and cytokines in breast milk of atopic and nonatopic women. *Allergy* 54(3): 206-211
- Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M.** 1999. Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Rev Reprod* 4: 81-89
- Sallusto F, Lanzavecchia A.** 2009. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 39(8): 2076-82
- Satthaporn S, Eremin O.** 2001. Dendritic cells (I) : biological functions. *J.R.Coll.Surg.Edinb* 46: 9-20
- Schelonka RL, Infante AJ.** 1998. Neonatal Immunology. *Seminars in Perinatology* 22(1): 2-14
- Schelonka RL, Yoder BA, desJardins SE, Hall RB, Butler J.** 1994. Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr* 125: 603-606
- Sedegah M, Hoffman SL.** 2006. Immunological responses of neonates and infants to DNA vaccines. *Methods Mol Med* 127: 239–251

- Siegrist CA.** 2003. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine* 21: 3406-3412
- Siegrist CA.** 2007. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Pathol* 137 Suppl 1: S4-9
- Skansen SU, Lindfors A, Andersson U.** 1993. Cytokine production in mononuclear cells of human milk studied at the single-cell level. *Pediatr Res* 34(2): 213-216
- Smith CW, Goldman AS.** 1968. The cells of human colostrum. I. In vitro studies of morphology and functions. *Pediatr Res* 2(2): 103-109
- Smith JB, Tabsh KMA.** 1993. Fetal Neutrophils and Eosinophils Express Normal Levels of L-Selectin. *Pediatr Res* 34(3): 253-257
- Sorg RV, Kogler G, Wernet P.** 1999. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c-population. *Blood* 93: 2302-2307
- Spiegelberg HL.** 1974. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv Immunol* 19(0): 259-94
- Srivastava MD, Srivastava A, Brouhard B, Saneto R, Groh WS, Kubit J.** 1996. Cytokines in human milk [see comments]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 93(3): 263-287
- Stinchcombe JC, Griffiths GM.** 2007. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 495-517
- Takahata Y, Takada H, Nomura A, Ohshima K, Nakayama H, Tsuda T, Nakano H, Hara T.** 2001. Interleukin-18 in human milk. *Pediatr Res* 50(2): 268-272
- Theilgaard-Monch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, Schjodt K, Heilmann C, Vindelov L, Jacobsen N, Dickmeiss E.** 2001. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant.* 28(11): 1073-82
- Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H.** 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10: 864-871
- Tucci A, Mouzaki A, James H, Bonnefoy JY, Zubler RH.** 1991. Are cord blood B cells functionally mature? *Clin exp Immunol* 84: 389-394
- Udall JN, Colony P, Fritze L, Pang K, Trier JS, Walker WA.** 1981. Development of gastrointestinal mucosal barrier. II. The effect of natural versus artificial feeding on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res* 15: 245-249
- Ueda Y, Hagihara M, Okamoto A, Higuchi A, Tanabe A, Hirabayashi K, Izumi S, Makino T, Kato S, Hotta T.** 2003. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol* 64: 1144-1151
- van Nierop K, de Groot C.** 2002. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol* 14(4): 251-7

- Vekemans J, Ota MO, Wang EC, Kidd M, Borysiewicz LK, Whittle H, McAdam KP, Morgan G, Marchant A.** 2002. T cell responses to vaccines in infants: defective IFN $\gamma$  production after oral polio vaccination. *Clin Exp Immunol* 127: 495-498
- Veldhoen M, Uytendhoeve C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B.** 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9: 1341-1346
- Velilla PA, Rugeless MT, Chougnnet CA.** 2006. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol* 121(3): 251-259
- Walport MJ.** 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344(14): 1058-66
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR.** 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14: 353-356
- WHO.** 2004. Prevention and Care of Illness. Neonates and Infants NEWBORN HEALTH AND SURVIVAL. A CALL TO ACTION
- Wiegering V, Eyrich M, Wunder C, Günther H, Schlegel PG, Winkler B.** 2009. Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children. *Eur Cytokine Netw* 20(2): 75-80
- Wirt DP, Adkins LT, Palkowetz KH, Schmalstieg FC, Goldman AS.** 1992. Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry* 13(3): 282-290
- Wolach B, Ben Dor M, Chomsky O, et al.** 1992. Improved chemotactic ability of neonatal polymorphonuclear cells induced by mild membrane rigidification. *J Leukocyte Biol* 51: 324-328
- Wong OH, Huang FP, Chiang AKS.** 2005. Differential responses of cord and adult blood-derived dendritic cells to dying cells. *Immunol* 116: 13-20
- Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R.** 2004. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 72: 1223-1229
- Yost ChC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, Chandler NB, Rodesch ChK, Albertine KH, Petti CA, Weyrich AS, Zimmerman GA.** 2008. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: A novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood* 113: 6419-6427
- Zou GM, Tam YK.** 2002. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *European Cytokine Network* 13(2): 186-99