

# Promjene staničnog i citokinskog sastava majčinog mlijeka tijekom akutne infekcije dojenčeta - uloga gama delta ( $\gamma\delta$ ) T limfocita

*Javna obrana teme doktorskog rada*

---

**Pristupnik:** Dragica Pavlović, mag. med. techn.



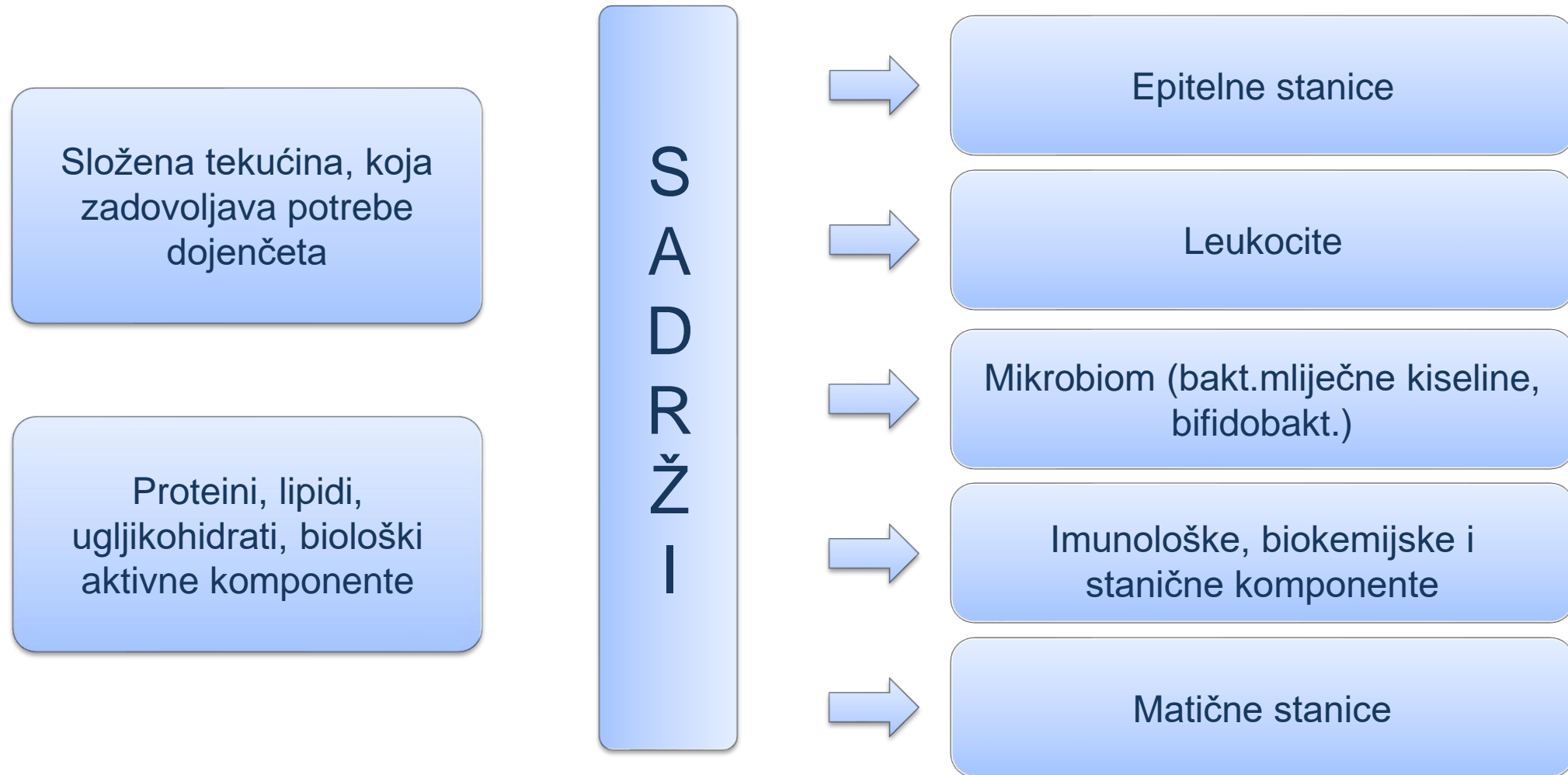
**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.  
**Komentor:** Izv.prof.dr.sc. Stana Tokić,

Osijek 16.1.2024.g.

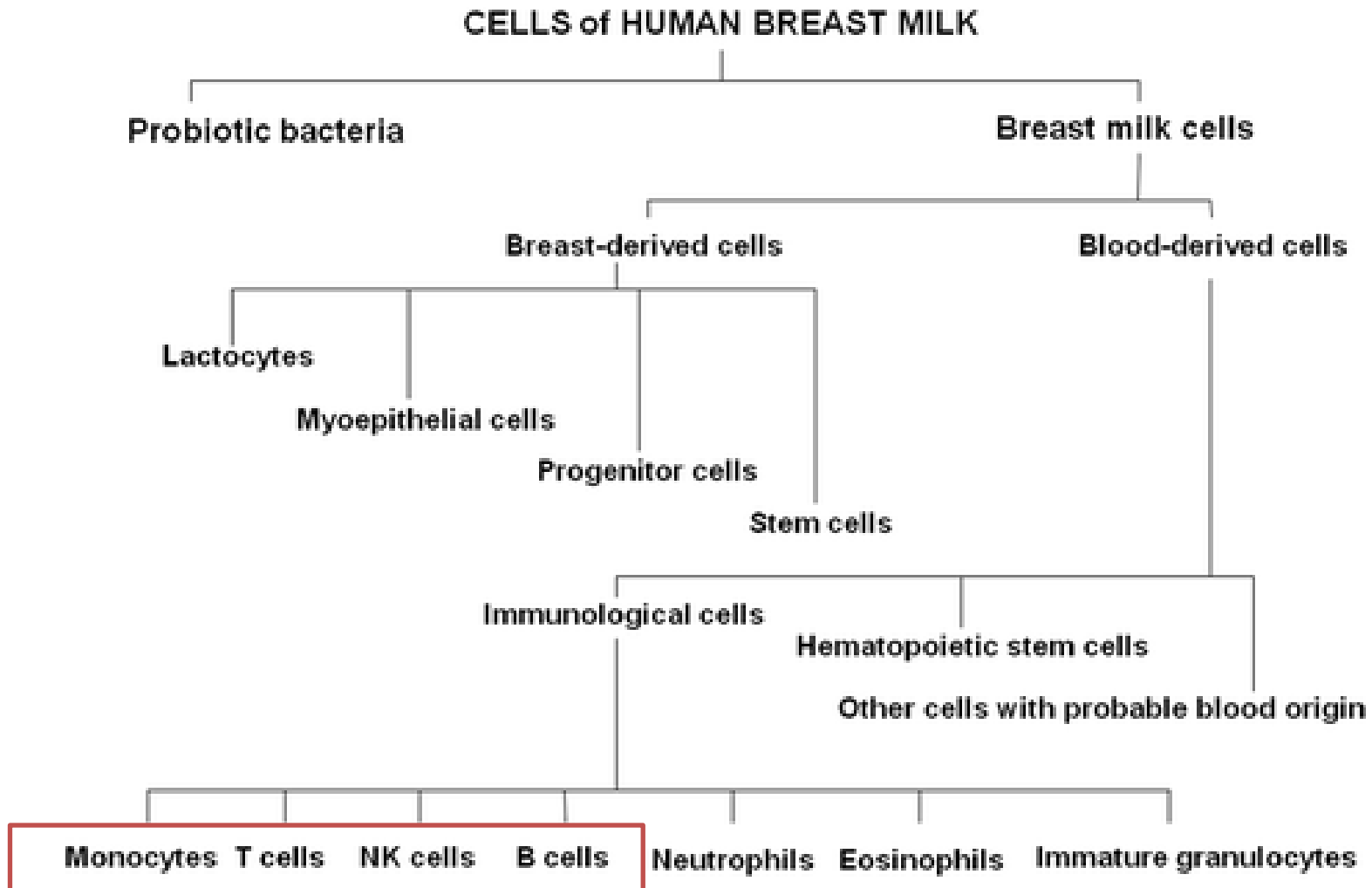
# Uvod I - Dojenje

- Dojenje → idealna prehrana za novorođenče
- Dojenje ima niz prednosti za dijete i majku
- SZO i UNICEF preporučuju da djeca započnu s dojenjem unutar prvog sata od rođenja i da budu isključivo dojena prvih 6 mjeseci života – što znači da im se ne daje nikakva druga hrana ili tekućina, uključujući vodu
- Mlijeko ima jedinstven sastav, razvijalo se milijunima godina

# Uvod II-Humano mlijeko (HM)



# Uvod II-Humano mlijeko (HM)



## Uvod II – Sastav humanog mlijeka (HM)

Individualne varijacije

Stupnju laktacije

Stanju punoće dojke

Hranjenju dojenčeta

Zdravlju dijade dojenja

# Uvod III – Humano mlijeko i imunost

Aktivna i pasivna imunost

Bogat izvor imunoglobulina, laktoferina,  
lizozima, citokina

1960. g. - kolostrum bogat leukocitima

Nova istraživanja - leukociti <2% stanica u  
zrelom mlijeku

Leukociti - aktivna imunost, štite mliječnu  
žlijezdu od infekcije

# Uvod III

Dokazi (studije na životinjama) - leukociti prolaze kroz probavni trakt, iz njega putem krvi idu u udaljena mjesta

Hassiotou i sur. pokazali su specifičan porast leukocita u HM kada je dojlja imala infekciju

Riskin i sur. - izvijestili o porastu leukocita u HM u trenutku infekcije dojenčeta

Prilagodba imunosnog sastava HM, dinamična interakcija između bolesnih beba i njihovih majki

# Uvod III

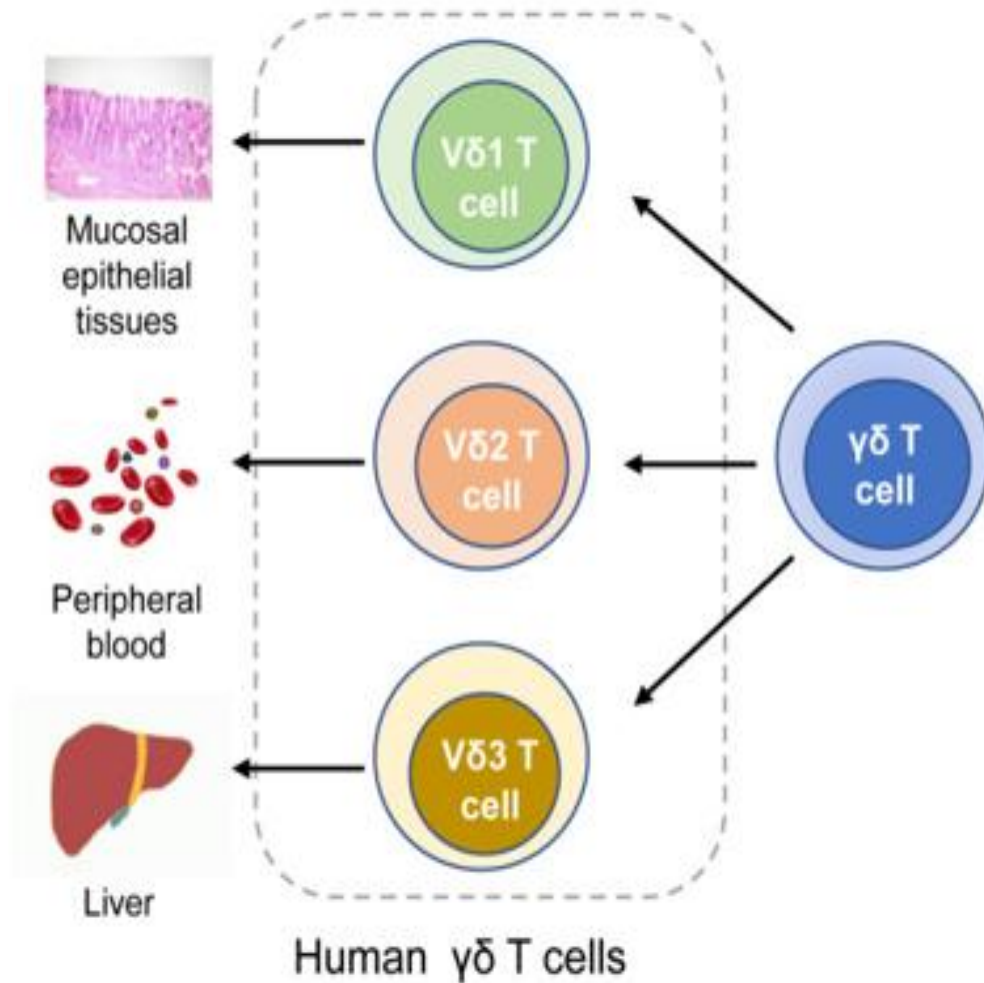
Zdravstveno stanje majke i djeteta utječe na sadržaj stanica HM

Infekcije majke stimuliraju odgovor leukocita u HM  
(0,7-93,6%)

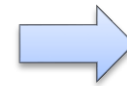
Mali porast leukocita u HM primijećen je i kad je dijete bolesno, a majka asimptomatska

# Gama-delta ( $\gamma\delta$ ) T stanice

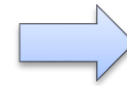
Manja su populacija (~ 0,5–5% ukupne krvi) T stanica koje izražavaju T stanični receptor (TCR) izgrađen od  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca



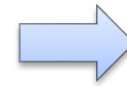
## Uloga u prvoj liniji obrane:



razne mikrobne inf

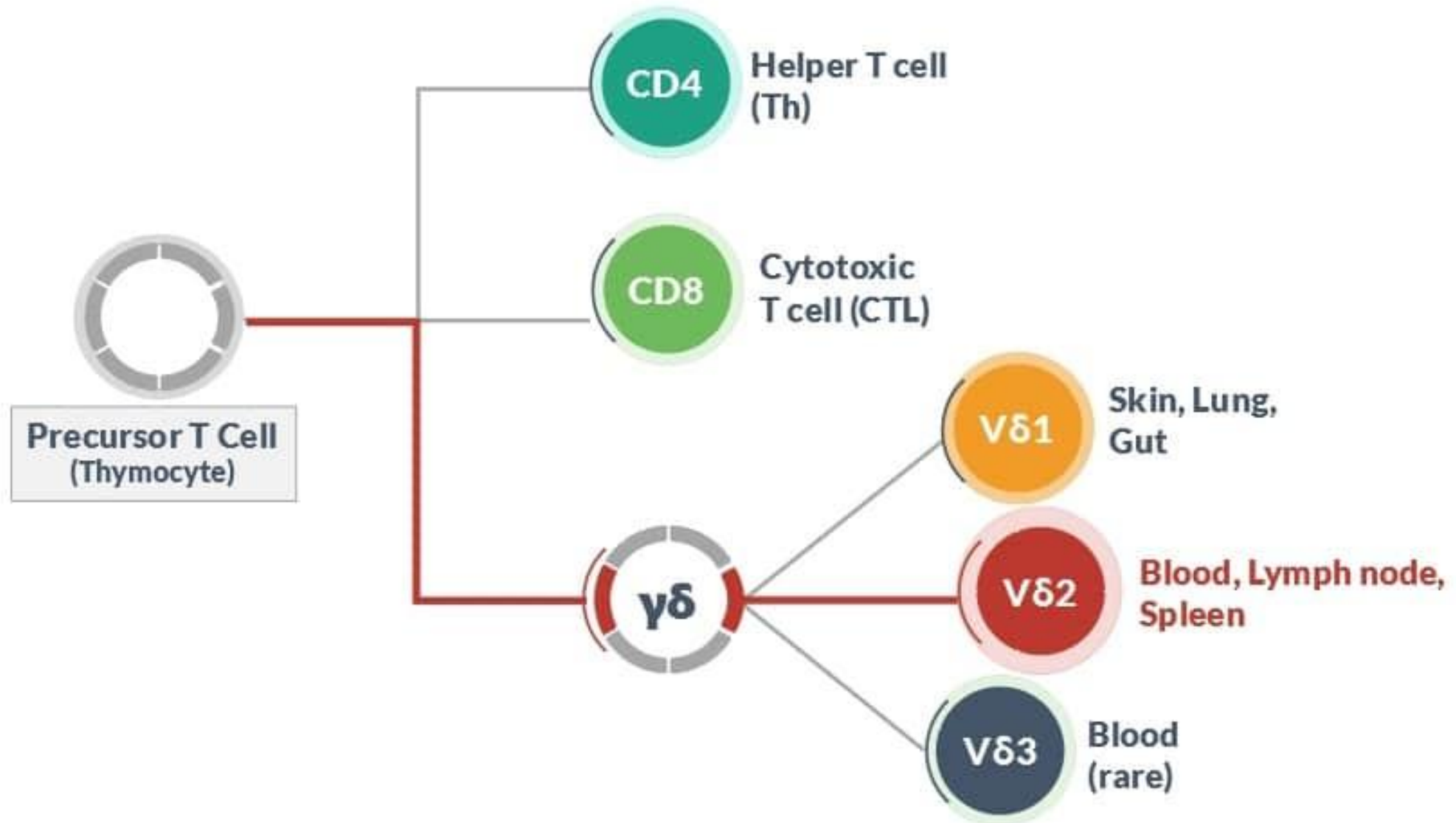


reguliraju imunološki nadzor raka



posreduju brojne antiupalne i regenerativne učinke

# Gama-delta ( $\gamma\delta$ ) T stanice



- Nepoznato je na koji se način tijekom infekcije dojenog djeteta mijenjaju udjeli klasičnih, adaptivnih B i T limfocitnih populacija, ukupnih CD3+ linija, pomoćničkih CD4+ i citotoksičnih CD8+ T stanica i prirodno ubilačkih NK limfocita te  $\gamma\delta$  T limfocitnih populacija.

# Hipoteza

Tijekom akutne infekcije dojenčeta majčino mlijeko se svojim staničnim, citokinskim i imunoglobulinskim sastavom prilagođava potrebama dojenčeta u svrhu obrane organizma od mikroorganizama.

# Ciljevi

- Imunofenotipizirati/odrediti zastupljenost i usporediti promjene udjela subpopulacija leukocita majčinog mlijeka (ukupni T limfociti, CD4 pomoćnički limfociti, CD8 citotoksični limfociti, NK stanice,  $\delta 1$  i  $\delta 2$  populacije  $\gamma\delta$  T limfocita, B stanice) tijekom akutne infekcije dojenčeta te nakon potpune rekonvalescencije (nakon 4-6 tjedana)
- Odrediti citokinski sastav mlijeka (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-17A, TNF $\alpha$ ) tijekom akutne infekcije dojenčeta te nakon potpune rekonvalescencije (nakon 4-6 tjedana)
- Odrediti imunoglobulinski profil mlijeka (IgG, IgA, IgE, IgM) tijekom akutne infekcije dojenčeta te nakon potpune rekonvalescencije (nakon 4-6 tjedana)

# Ustroj istraživanja

Istraživanje je dizajnirano kao prospektivno eksperimentalno istraživanje



Ispitanice regrutirane:

→ pedijatrijske ordinacije PZZ

→ hitna pedijatrijska ambulanta  
KBCO

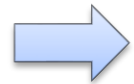
# Ispitanici

**Broj ispitanika: min 20 uparenih uzoraka**

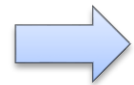
Veličina učinka (Cohenov d,  $\Delta/SD$ ) potrebna za statističku snagu od 80% uz dvostrani  $\alpha=0,05$ , t- test, 2 ovisne skupine, normalna distribucija, iznosi 0,8 za uzorak od 15 ispitanika (GPOWER v3.1.9.4). Za procijenjene (Lazar et al. 2024; Bedin et al. 2018.), očekivane aritmetičke sredine učestalosti CD3+ (25.1% %), CD4+T (51.8 %), CD8+T (33,7 %), NK (4.7 %), NKT (3.6 %) i CD3+  $\gamma\delta$  T (10 %) stanica u humanom mlijeku zdravih osoba, uz pripadne standardne devijacije od 14.4 %, 9.3 %, 6.0 %, 3.2 %, 2.3% i 3 %, razlika aritmetičkih sredina ( $\Delta$ ) iznosi 9.9 %, 7.2 %, 5.3%, 3.3 %, 1.9% i 3%, odgovarajući biološki umjerenom do velikom učinku. Slijedom navedenog, Cohenov d fiksiran je na 0,8, odgovarajući biološki velikom učinku.

# Ispitanici

## Uključni kriteriji

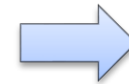


majke (bez znakova infekcije)  
koje doje dijete  
sa znakovima infekcije

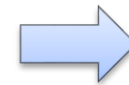


Dojenčad od 1,5 – 15 mj starosti

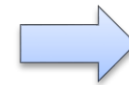
## Isključni kriteriji



Ne punoljetne ispitanice



Ispitanice koje ne doje dojenče.



Ispitanice s kliničkim/lab.  
znakovima akutne infekcije.

# Plan istraživanja

U  
Z  
O  
R  
A  
K



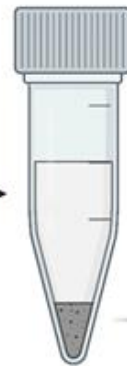
3-5 DANA

50 – 100 ml



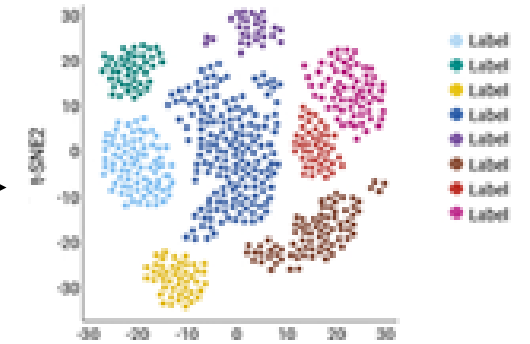
CENTRIFUGIRANJE

IZOLACIJA  
STANICA



PROTOČNA CITOMETRIJA

REZULTATI



K  
O  
N  
T  
R  
O  
L  
A



4-6 TJEDANA



# Etičko povjerenstvo

DZOBŽ

KBCO

MFO

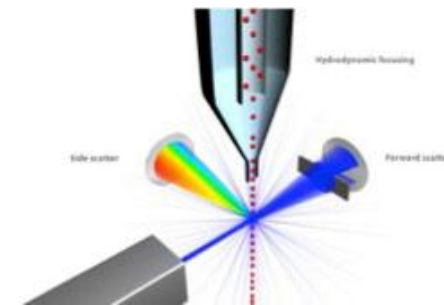
Informirani pristanak

Obavijest za ispitanike o istraživanju

Anketni upitnik

# Metode - izolacija stanica

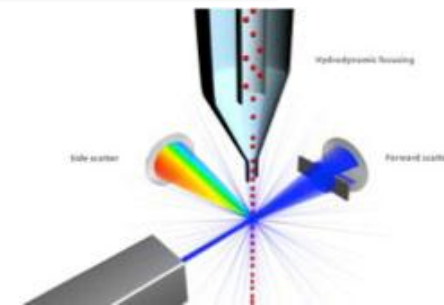
- Uzorci će biti centrifugirani 600 x g, 15 min, 4°C → odvajanje stanične, vodene i masne komponente
- Staničnu fazu pripremiti za imunofenotipizaciju leukocita → odvajanje mononukleara na gradijentu fikola
- Izbrojati stanice pomoću Luna brojača



# Metode - protočna citometrija

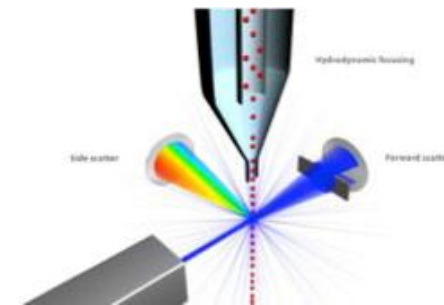
Bojenje površinskih staničnih antigena (standardni protokoli)

- Mrtve stanice obilježiti 0,5  $\mu$ l Fixable Viability eFluor 780 e bojom
- Isprati stanice s 1ml PBS-a
- Nespecifično bojenje, 5  $\mu$ l Human TruStain FcX
- Dodati pripremljena protutijela
- Analiza na protočnom citometru



# Metode - protočna citometrija

- Mjerenja uzoraka će biti provedena na BD FACSLyric™ protočnom citometru (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), opremljenim s 3 lasera (plavim Argon 488 nm, Red HeNe 633 nm i ljubičasti 403 nm)
- Analiza i vizualizacija podataka bit će učinjena pomoću FlowLogic programa (v11,0; Inivai Technologies; Mentone; Australija).



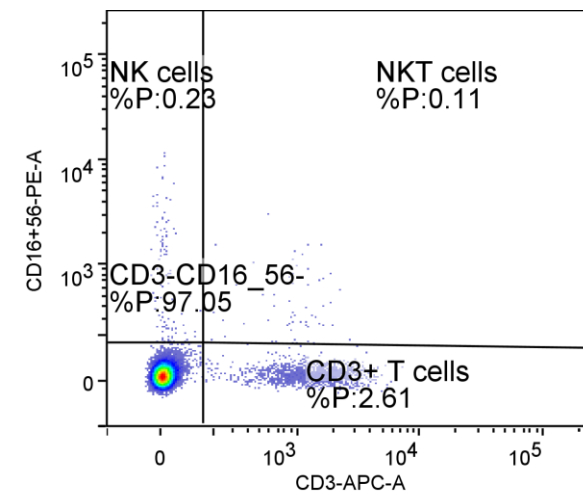
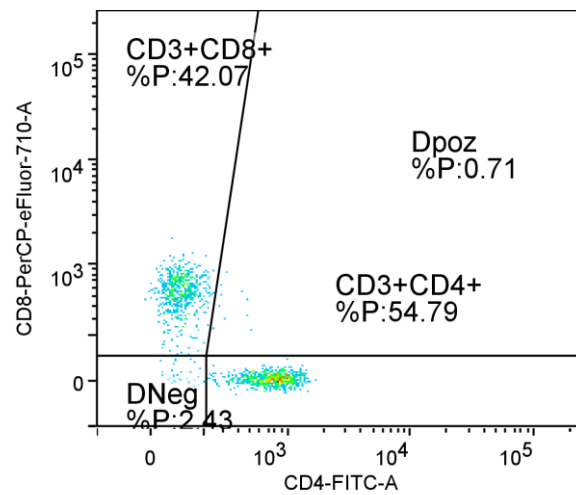
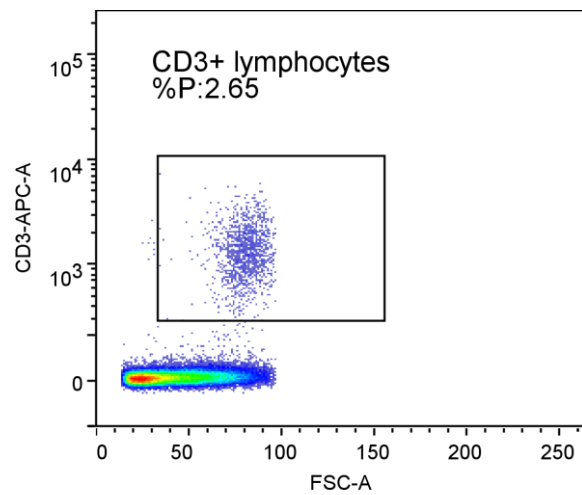
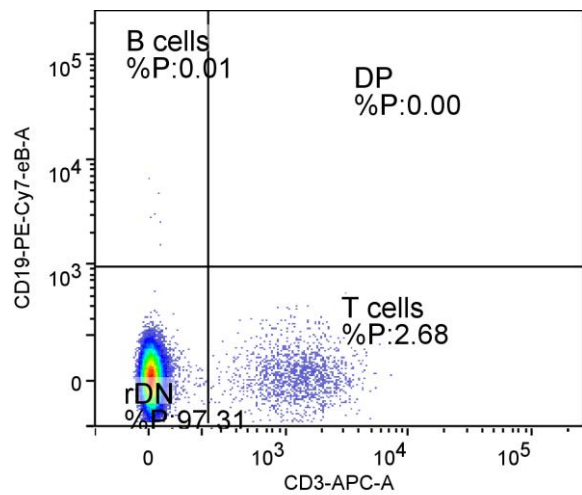
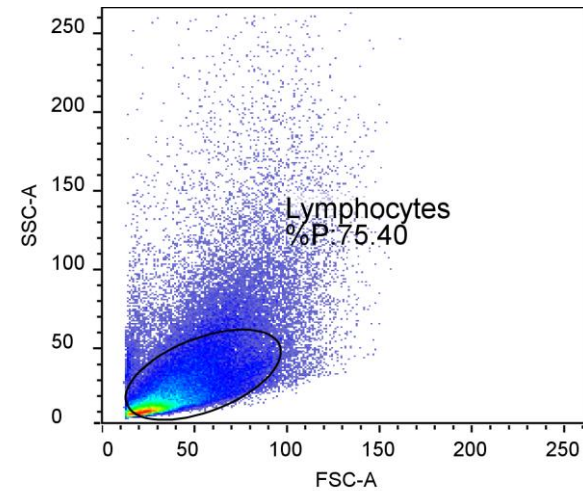
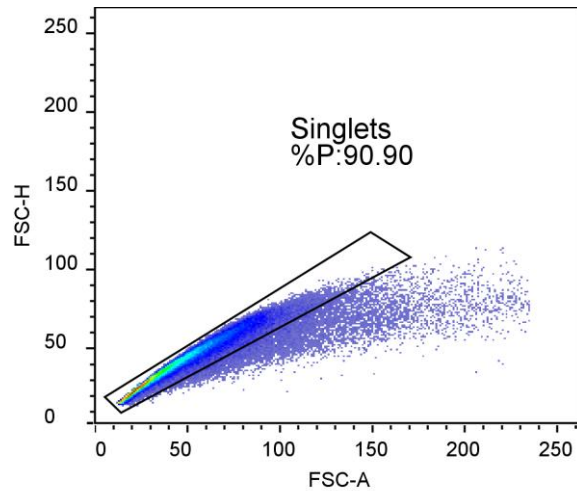
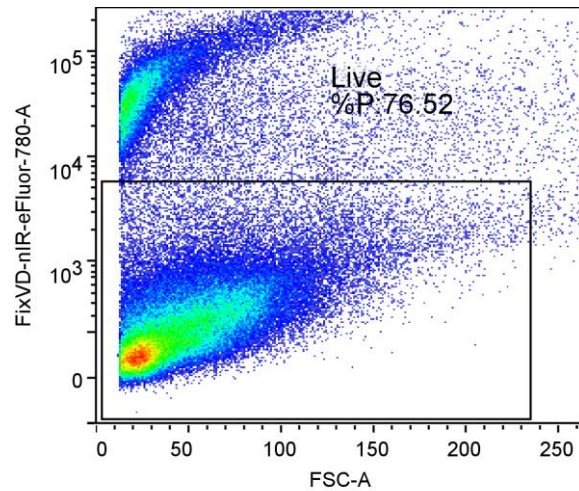
# Fenotip stanica u analizi HM

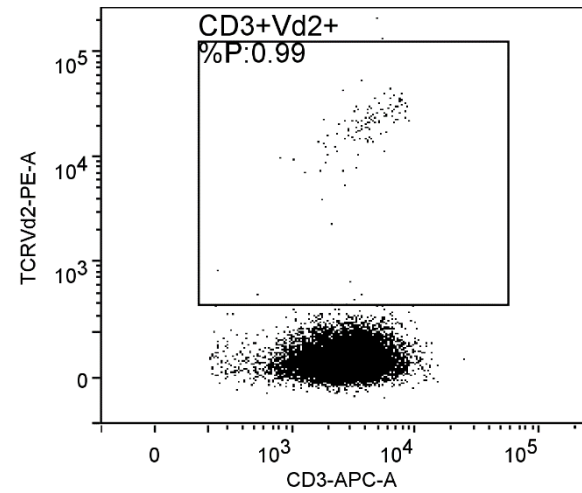
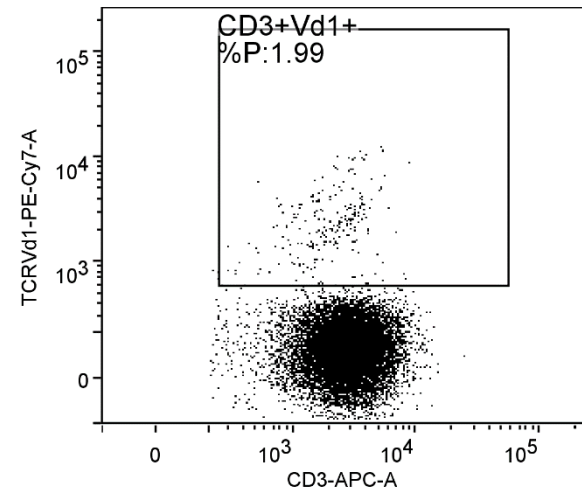
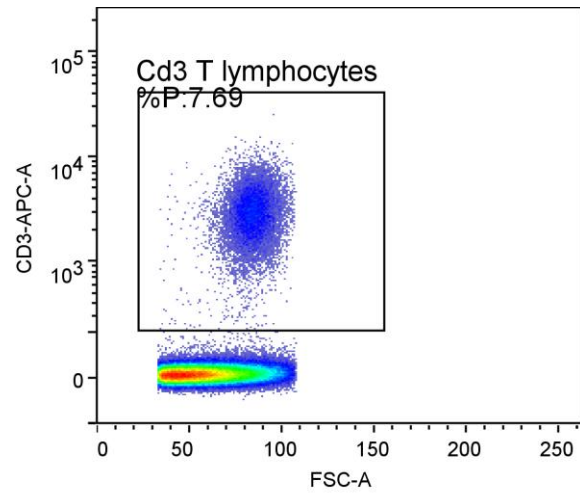
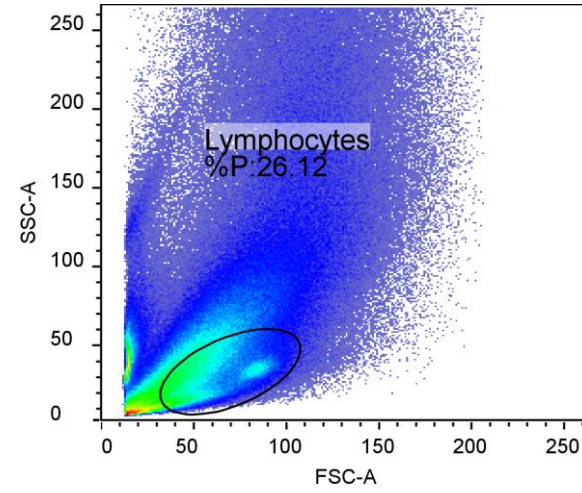
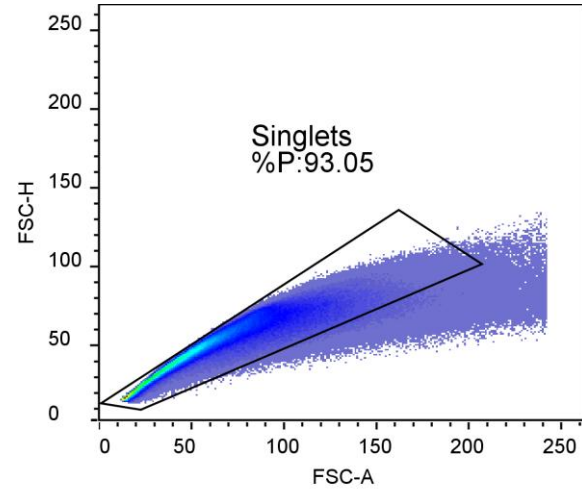
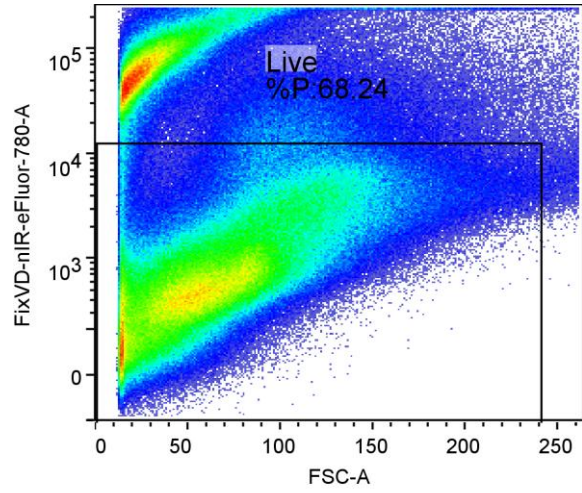
## Vrsta stanice

## CD marker

→	Ukupne T stanice
→	T pomoćničke stanice
→	T citotoksične stanice
→	B stanice
→	NK stanice
→	NKT stanice
→	γδ T stanice

→	CD3+
→	CD3+ CD4+
→	CD3+ CD8+
→	CD19+
→	CD3- CD56/16+
→	CD3+ CD56/16+
→	CD3+ γδ TCR +





# Statističke metode

- Kategorijski podatci bit će prikazani apsolutnim i relativnim frekvencijama.
- Numerički podatci bit će opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (u normalnim raspodjelama) ili medijanom i granicama interkvartilnog raspona (u ostalim raspodjelama).
- Razlike između kategorijskih varijabli testirat će se Hi-kvadrat testom s mogućim korištenjem Fisherovog egzaktnog testa
- Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju zavisnih skupina bit će testirane t testom za ponavljana mjerenja, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Wilcoxonovim testom.
- Povezanost između normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenit će se Pearsonovim koeficijentom korelacije  $r$ , dok će se u slučaju odstupanja od normalne raspodjele koristiti Spearmanov koeficijent korelacije  $\rho$ .
- Sve P vrijednosti bit će dvostrane, a razina značajnosti postavljena na  $\text{Alpha}=0,05$ .
- Za statističku analizu koristit će se MedCalc Statistical Software version 17.8.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2017).

# Očekivani znanstveni doprinos

Rezultati predloženog istraživanja će doprinijeti boljem razumijevanju načina na koji majčino mlijeko, prilagodbom svog staničnog, citokinskog i imunoglobulinskog sastava pruža imunološku (antimikrobnu) zaštitu dojenčetu tijekom akutne infekcije.

# Literatura

Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Perez.Cano FJ, Castell M, Moretones MG et al. Premature Delivery Influences the Immunological Composition Of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. The Journal of Nutrition. 2011;146(6):1181-7.

Pavičić Bošnjak A, Grgurić J. Dojenje: ne samo nutritivni, već i razvojni čimbenik. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; Odsjek za neonatologiju, Klinika za ženske bolesti i porode, Klinička bolnica „Mercur“. Zagreb. 2005;1:2-2.

Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GWA, Horton S, et al. Breastfeeding in the 21<sup>st</sup> century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. Lancet. 2016;387:475-490.

Lawerence RA, Lawerence RM. Breastfeeding. A Guide for the Medical Profession. 8<sup>th</sup> ed. Canada: Elsevier; 2016.

Witkowska- Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. Cellular& Molecular Biology Letters. 2017;22-22.

Bedin AS, Moles JP, Rutagwera D, Nagot N, Kankasa C, Tylleskar T, et al. MAIT cells, TCR  $\gamma\delta$ ,+ cells and ILCs cells in human breast milk and blood from HIV infected and uninfected women. Pediatr Allergy Immunol.2019;30:479-487.

UNICEF. Priručnik za provođenje inicijative „Rodilište prijatelj djece“. Zagreb: Kratisd.o.o; 2007.

Pavičić Bošnjak A. Grupe za potporu dojenju. Zagreb: Unicef; 2014.

# Literatura

American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012;129(3):827-41.

Hassiotou F, Hepworth AR, Metzger P, Tat Lai C, Trengove N, et al. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin Trans Immunology*. 2013;1-10.

Smith CW, Goldman AS. The cells of human Colostrum. In vitro studies of morphology and functions. *Pediat Res*. 1968;2:103–109.

Smith CW, Goldman AS. Interactions of lymphocytes and macrophages from human colostrum: characteristics of the interacting lymphocyte. *J Reticuloendothel*. 1970;8:91–104.

Rulan M, Dawei Y, Yizhan G, Rong Y, Kang L. Immune Effects of  $\gamma\delta$  T Cells in Colorectal Cancer: A Review. *Front. Immunol*. 2020;11.

Riskin A, Almog M, Peri R, Halasz K, Srugo I, et al. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Ped Res*. 2012;71:220-5.

Sourov P, Lal S, Lal G. Role of gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells in autoimmunity. *Journal of leukocyte biology*. 2015;97:259-271.

Wu Y, Wu W, Wong WM, Ward E, Thrasher AJ, Goldblatt D et al. Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *Journal of Immunology*. 2009;183(9):562-569.

Lazar K et al. Frequencies of activated T cell populations increase in breast milk of HCMV-seropositive mothers during local HCMV reactivation. *Frontiers in Immunology*. 2024;14.

Bedin AS et al. MAIT cells, TCR  $\gamma\delta$ + cells and ILCs cells in human breast milk and blood from HIV infected and uninfected women. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2019;30.