

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Dragica Pavlović

**PROMJENE STANIČNOG I CITOKINSKOG SASTAVA MAJČINOGLIJEKA
TIJEKOM AKUTNE INFEKCIJE DOJENČETA – ULOGA GAMA DELTA ($\gamma\delta$) T
LIMFOCITA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Dragica Pavlović

**PROMJENE STANIČNOG I CITOKINSKOG SASTAVA MAJČINOGLIJEKA
TIJEKOM AKUTNE INFEKCIJE DOJENČETA – ULOGA GAMA DELTA ($\gamma\delta$) T
LIMFOCITA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.

Rad je izrađen na Medicinskom fakultetu Osijek.

Komentor rada: Izv. prof. dr. sc. Stana Tokić

Rad ima 125 listova/stranica

Predgovor radu

Na kraju ovog dugog putovanja, željela bih se zahvaliti svima koji su doprinijeli u izradi mog doktorskog rada.

Prije svega želim se iznimno zahvaliti mentorici izv.prof.dr.sc.Martini Mihalj koja me prijateljski vodila u istraživanju i izradi doktorske disertacije. Martina, hvala ti na savjetima, kontinuiranoj podršci, prijateljstvu te strpljenju i hrabrosti tijekom ovog putovanja.

Želim se zahvaliti i komentorici izv. prof. dr. sc. Stani Tokić što je omogućila da pri njezinoj katedri radim istraživanje. Hvala na podršci i velikoj pomoći u laboratorijskom dijelu istraživanja i pri izradi doktorske disertacije. Hvala i na svim prijateljskim savjetima, pomoći i strpljenju tijekom svih faza istraživanja.

Hvala prof. dr. sc. Mariju Štefaniću na pomoći pri interpretaciji i vizualizaciji rezultata.

Hvala Maji i Ivani na velikoj pomoći u edukaciji za laboratorijski dio istraživanja.

Hvala doc. dr. sc. Mirjani Suver-Stević, dr.sc.Barbari Vuković i Blaženki Dobrošević, spec. med. biokemije na pomoći pri očitavanju rezultata istraživanja.

Sve ovo bi bilo teško ostvariti bez moje matične ustanove Doma zdravlja Osječko-baranjske županije (DZOBŽ), ravnatelja i mojih kolegica patronažnih sestara, hvala vam od srca.

Zahvaljujem se malim i velikim ispitanicima bez kojih bi ovo istraživanje bilo nemoguće provesti. Hvala svim majkama koje su pristale biti dio ovog istraživanja.

Na kraju hvala svima koji su tijekom godina bili dio ovog putovanja i na bilo koji način doprinijeli izradi disertacije: kolegicama, ravnateljima DZOBŽ, pedijatrima, profesorima, Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo, KBC Osijek, Brankici, Mati, Vladi i Andreji J.

Hvala Andreji Majić na podršci i tehničkoj pomoći prilikom izrade disertacije.

Posebna zahvala ide mojim roditeljima Jeli i Marku Lukić. Hvala i sestri Kaji i bratu Zoranu što su uvijek prisutni na svakom mom putu.

I na kraju najvažnije najveća zahvala mojoj djeci Marti, Pauli i Ivanu te suprugu Oliveru.

Hvala vam na nesebičnoj podršci, ljubavi i motivaciji. Bez vas sve ovo bi bilo nemoguće.

Rad posvećujem Marti, Pauli i Ivanu, a posebno suprugu Oliveru!

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Definicija dojenja	3
1.2. Faze laktacije.....	4
1.3. Korisni učinci dojenja na dijete i majku	4
1.3.1. Korisni učinci dojenja na dijete	4
1.3.2. Korisni učinci dojenja na majku	6
1.4. Hormonska regulacija lučenja majčinog mlijeka	6
1.5. Sastav majčinog mlijeka	8
1.6. Prilagodba majčinog mlijeka potrebama djeteta u zdravlju i bolesti	9
1.7. Nestanične nutritivne komponente majčinog mlijeka.....	11
1.7.1. Voda.....	12
1.7.2. Masti	12
1.7.3. Bjelančevine.....	13
1.7.4. Ugljikohidrati.....	14
1.7.5. Mikronutritijenti.....	14
1.8. Nestanične bioaktivne sastavnice majčinog mlijeka.....	14
1.8.1. Imunoglobulini.....	15
1.8.2. Ostali bioaktivni faktori	16
1.9. Stanične komponente majčinog mlijeka	17
1.9.1. Leukociti	18
1.9.2. Netrofili i makrofagi	19
1.9.3. Limfociti	20
1.9.4. T limfociti	21
1.9.5. B limfociti	22
1.9.6. Prirodnoubilačke (NK od engl. “natural killer”) stanice	22
1.10. Prirođena i stečena imunost.....	23

1.10.1.	Prirodna imunost	23
1.10.2.	Stecena imunost	23
1.10.3.	$\gamma\delta$ T limfociti.....	27
1.11.	Razvoj imunološkog sustava dojenčeta.....	30
1.11.1.	Postnatalni razvoj imunološkog sustava	30
1.11.2.	Uloga majčinih staničnih i humoralnih čimbenika u imunološkoj zaštiti novorođenčeta.....	30
1.11.3.	Imunost sluznica.....	32
2.	Hipoteza.....	34
3.	Ciljevi istraživanja	35
4.	Ispitanici i metode.....	36
4.1.	Ustroj studije	36
4.2.	Ispitanici.....	36
4.3.	Metode.....	37
4.3.1.	Imunofenotipizacija leukocita majčinog mlijeka metodom protočne citometrije	38
4.3.2.	Utvrđivanje koncentracije imunoglobulina i citokina u majčinom mlijeku	44
4.3.3.	Utvrđivanje koncentracije Ig - IgG1, IgG2, gG3, IgG4, IgA, IgE i IgM.....	44
4.3.4.	Utvrđivanje koncentracije citokina IFN- γ , IL-1 β , IL-17A (CTLA-8), IL-4, IL-6 i TNF- α	45
4.4.	Statističke metode	46
5.	Rezultati.....	48
5.1.	Deskriptivna analiza.....	48
5.2.	Imunofenotipizacija.....	50
5.3.	Distribucija imunoglobulina u humanom mlijeku	52
5.4.	Globalni pregled.....	55
5.5.	Koncentracija imunoglobulina u mlijeku, usporedba između majki s oboljelim i majki sa zdravom djecom	59

5.6. Longitudinalne promjene sastava mlijeka u oboljele djece (usporedba rane i kasne laktacije).....	63
5.7. Parne usporedbe u kontrolnom intervalu	65
5.8. Povezanost Ig profila mlijeka s demografskim, kliničkim i biokemijskim obilježjima majke i djeteta.....	65
5.9. Citokini.....	70
6. Rasprava.....	75
6.1. Stanični sastav majčinog mlijeka te njegove promjene tijekom akutne infekcije djeteta	75
6.2. Distribucija imunoglobulina u humanom mlijeku	77
6.3. Promjene sastava imunoglobulina majčinog mlijeka tijekom akutne infekcije dojenčeta	81
6.4. Povezanost imunoglobulinskog profila s demografskim i kliničkim obilježjima majke i djeteta.....	83
6.5. Promjene citokinskog sastava majčinog mlijeka tijekom akutne infekcije dojenčeta	84
7. Zaključci	90
8. Sažetak	95
9. Summary.....	97
10. Literatura.....	99
11. Životopis	117
12. Prilozi.....	125

Popis kratica korištenih u tekstu

ACP – antigen prezentirajuća stanica

AMF – adaptirana mliječna formula

ALA – alfa lipoična kiselina

CDC – konvencionalne dendričke stanice

COVID 19 – koronavirusna bolest 2019 (engl. *coronavirus disease 2019*)

DAMP – molekularni uzorak povezan s oštećenjem tkiva

DHA – dokosaheksaenoična kiselina

DN – dvostruko negativni

DZOBŽ – Dom zdravlja Osječko-baranjske županije

FcRn – neonatalni Fc receptor

FIL – faktor koji inhibira laktaciju

GIT – gastrointestinalni trakt

HIV – virus humane imunodeficijencije

HM – humano mlijeko

HMM – mikrobiota ljudskog mlijeka

Ig – imunoglobulin

ID – isključivo dojenje

IFN – interferon gama

IL – interleukin

IQ – kvocjent inteligencije

ITM – indeks tjelesne mase

KBCO – Klinički bolnički centar Osijek

LCPUFA – dugolančane polinezasićene masne kiseline

MHC – histokompatibilni kompleks

MPS – mononuklearni fagocitni sustav

MUFA – monozasićene masne kiseline

NEC – nekrotizirajući enterokolitis

NK stanice – prirodno ubilačke stanice

PAMP – antigena molekularni uzorak povezan s patogenima

PD – pretežito dojenje

PIF – faktor koji inhibira prolaktin

PTHrP – protein povezan s paratireoidnim hormonom

PSR – lančanu reakciju polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction)

PUFA – polizasićene masne kiseline

SZO – svjetska zdravstvena organizacija

Tc – citotoksični T limfocit

TGF – transformirajući faktor rasta

TNF α – tumor nekroza čimbenik alfa

sIg – sekretorni imunoglobulin

SIDS – Sudden Infant Death Syndrome (Sindrom iznenadne dojenačke smrti)

UAB – od. eng. Universal Assay Buffer

$\gamma\delta$ – gama delta

Popis tablica

Tablica 1.1. Biokemijski sastav majčinog mlijeka, razlike kolostrum vs. zrelo mlijeko	9
Tablica 1.2. Svojstva urođene i adaptivne imunosti	26
Tablica 5.1. Demografska, klinička i biokemijska obilježja majki i njihove dojenčadi.	49
Tablica 5.2. Protočna citometrija, frekvencije izabranih populacija stanica u mlijeku majke, podjela prema statusu dojenčeta i fazi bolesti. Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.....	52
Tablica 5.3. Udjeli (%) pojedinih klasa (G1-G4) u ukupnom IgG, mlijeko majki.....	53
Tablica 5.4. Analiza redundancije, kondicionalni učinci, usporedba Ig profila mlijeka majki zdrave i oboljele djece.	61
Tablica 5.5. Usporedba mjerenih vrijednosti imunoglobulina (Ig, medijan s interkvartilnim rasponom) mlijeka majki za zdravu i oboljelu dojenčad, nestratificirana analiza.....	67
Tablica 5.6. Usporedba mjerenih vrijednosti imunoglobulina (Ig, medijan s interkvartilnim rasponom) mlijeka majki za zdravu i oboljelu dojenčad, rana laktacijska dob (≤ 5 mjeseci)... ..	68
Tablica 5.7. Generalni linearni model, usporedba oboljelih i zdravih, glavni efekti, zasebno za akutnu i konvalescentnu fazu.....	69
Tablica 5.8. Dihotomizirana mjerenja izabranih citokina u mlijeku majke oboljele djece.	71
Tablica 5.9. Dihotomizirana mjerenja TNF u mlijeku majke oboljele djece, faza oporavka, podjela prema duljini laktacije.....	72

Popis slika

Slika 1.1. Razdvajanje mlijeka na sloj masti i vodenu fazu	8
Slika 1.2. Stanice prisutne u majčinom mlijeku	18
Slika 1.3. Urođena i adaptivna imunost.....	25
Slika 1.4. Glavne populacije ljudskih $\gamma\delta$ T stanica	29
Slika 4.1. Analiza staničnog sastava mlijeka pomoću protočne citometrije.....	40
Slika 4.2. Analiza udjela $\gamma\delta$ T limfocita u majčinom mlijeku pomoću protočne citometrije ...	42
Slika 4.3. Shematski prikaz protokola istraživanja za stanice mlijeka	43
Slika 4.4. Uređaju Luminex® 200™ i računalnog programa xPonent®.....	45
Slika 5.1. Distribucija staničnih frekvencija za izabrane populacije po skupini i fazi bolesti..	51
Slika 5.2. Razdioba masenih koncentracija imunoglobulinskih klasa u mlijeku majki prema skupinama, svi uzorci, prvo mjerenje.	53
Slika 5.3. Toplinska mapa, korelacijska analiza	55
Slika 5.4. Analiza glavnih komponenti (PCA) za imunoglobulinski profil.....	55
Slika 5.5. Analiza redundancije (RDA)	57
Slika 5.6. Vektorska polja.....	58
Slika 5.7. Razdioba masenih koncentracija ukupnog imunoglobulina u mlijeku po skupinama i vremenu.	59
Slika 5.8. Bivarijatne mape gustoće opažanja za IgE, odvojeno prema statusu djeteta.	60
Slika 5.9. Razdioba masenih koncentracija Ig klasa u mlijeku po skupinama i vremenu.	62
Slika 5.10. Analiza redundancije (RDA), mjerenja akutne faze (IgG1 i IgG2).....	63
Slika 5.11. Korelacija rangova (mlijeko majki oboljele djece)	64
Slika 5.12. Distribucija mjerenja IL-6 u mlijeku majki prema statusu i fazi bolesti.	72
Slika 5.13. Distribucija mjerenja IL-1 u mlijeku majki prema statusu i fazi bolesti.	73
Slika 5.14. Dob majke i leukociti oboljelog djeteta za dihotomizirane vrijednosti IL-6 mjerene u oporavku.	73
Slika 5.15. Distribucija izabranih imunoglobulina u mlijeku majki za dihotomizirane vrijednosti IL-6 mjerene u oporavku.	74

Slika 5.16. Gustoća opažanja za IL-6 u mlijeku majki, konvalescentna faza.....	74
--	----

1. Uvod

Dojenje je prirodan način prehrane koji je svojstven svim vrstama sisavaca, uključujući i ljude. Prehrana dojenčeta majčinim mlijekom omogućavala je preživljavanje ljudskog roda tijekom više milijuna godina, od vremena postanka ljudske vrste (1,2). Stoga i ne čudi da se ljudsko mlijeko u prošlosti nazivalo eliksirom života (3). Međutim, u drugoj polovici 20. stoljeća umjetna prehrana koja podrazumijeva prehranu adaptiranim kravljim mlijekom postaje sve više zastupljena kako u razvijenim tako i u nerazvijenim zemljama. Hambraeus to naziva „jednim od najvećih nekontroliranih bioloških eksperimenata na svijetu“ (1).

Nakon određenog vremena zamijećeni su kako kratkoročni, tako i dugoročni nedostaci umjetne prehrane, a znanstvena istraživanja otkrila su brojne povoljne učinke majčinog mlijeka zbog čega je Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) donijela jedinstvenu definiciju isključivog dojenja (ID). Prema toj definiciji isključivo dojenje je prehrana djeteta majčinim mlijekom (uključujući izdojeno mlijeko ili mlijeko zamjenske dojilje) tijekom prvih šest mjeseci života bez ikakvih drugih dodataka (osim vitamina, minerala, lijekova i oralnih rehidracijskih soli po potrebi), s nastavkom dojenja uz primjerenu dohranu djeteta do navršene druge godine života ili dulje (4–10). Ova definicija isključuje upotrebu bilo kakve druge vrste hrane i pića osim majčinog mlijeka tijekom prvih šest mjeseci života djeteta. Isključivo dojenje najučinkovitija je intervencija za smanjenje smrtnosti djece mlađe od 5 godina u zemljama s niskim prihodima i procjenjuje se da sprječava 13 % smrtnosti djece (11). U skladu s time SZO pokreće kampanje promicanja isključivog dojenja te potiče globalnu edukaciju društva o prednostima majčinog mlijeka u usporedbi s tvorničkim mliječnim pripravcima za dojenčad, kao i dobrobitima koje dijete i majka stječu dojenjem. Stav majki prema dojenju ima utjecaj na duljinu dojenja. One majke koje dojenje doživljavaju zdravijim, lakšim i praktičnijim doje dulje od onih koje smatraju da je dojenje restriktivno i neugodno (12). Pozitivan stav partnera prema dojenju, pozitivan stav lokalne zajednice, pomoć dojilji u kući, prethodno pozitivno iskustvo majke u dojenju i visok stupanj obrazovanja pozitivno utječu na duljinu dojenja (13,14). Ljudsko mlijeko je jedinstveno prilagođeno ljudskom dojenčetu svojim prehrambenim sastavom, ali i neprehrambenim bioaktivnim čimbenicima koji potiču preživljavanje i zdrav rast i razvoj (4).

Osim toga, majčino mlijeko nije inertna otopina kontinuiranog sastava, već se njegov sastav mijenja ovisno o gestacijskoj dobi, dobi djeteta, dnevno tijekom podoja te između majki i populacija, a ovisi i o prehrani majke (4,7,8). Znanstvena istraživanja sugeriraju da je sastav

majčinog mlijeka svake dojilje drugačiji te da se mlijeko svake majke prilagođava potrebama njenog djeteta. Stoga se majčino mlijeko smatra zlatnim standardom u prehrani dojenčadi, a osim što osigurava optimalne hranjive tvari potrebne za normalan rast i razvoj, istraživanja su pokazala da sadrži i brojne bioaktivne komponente poput imunoglobulina, citokina, čimbenika rasta te stanice među kojima se ističu leukociti i matične stanice (15,16). Majčino mlijeko sadrži i esecijalne masne kiseline, enzime, hormone, faktore rasta, poliamine i druge biološke aktivne spojeve koji imaju važnu ulogu u zdravstvenim dobrobitima koja su povezana s dojenjem (17,18). Ljudsko mlijeko sadržava u sebi stanice koje su dobivene iz krvi (19), vitamina, antitijela i drugih čimbenika izvedenih iz stanica (izvanstaničnih vezikula, nukleinskih kiselina, enzima, polisaharida, lipida, i hormoni) (20).

Dokazana je prisutnost i probiotičkih bakterija u mlijeku (16,17).

Stanice dobivene iz dojke su laktociti i mioepitelne stanice te progenitorne i matične stanice (21). Velik broj stanica dobivenih iz majčinog mlijeka prenosi se na dojenče prije zatvaranja crijeva i dovodi do učinkovitijeg i do djelotvornijeg sazrijevanja imuniteta sluznice i/ili sistemskog imuniteta (16). Imunološke stanice kao što su B i T limfociti, regulatorne stanice, monociti/makrofagi, neutrofili, prirodne stanice ubojice i imunoglobulini (Ig), imunoglobulin A (IgA), imunoglobulin G (IgG) i imunoglobulin M (IgM) antitijela nalaze se također u majčinom mlijeku (17).

Društvene promjene u 20. stoljeću dovele su do smanjenja prevalencije dojenja u većini zemalja, osobito onim razvijenijima. Upravo zbog toga pokrenuta su brojna istraživanja kako bi se ukazalo na zaštitne učinke koje dojenje ima i za dijete, ali i za majku. Zagovaranje dojenja dovelo je 1981. godine do donošenja Međunarodnog kodeksa SZO o marketingu nadomjestaka za majčino mlijeko i 1990. godine do Innocenti deklaracije o dojenju (22). Upravo ta dva dokumenta pomogla su u pokretanju promocije dojenja s ciljem povećanja stope dojenja i vraćanju evolucijskim korijenima.

Vlastito mlijeko majke smatra se najboljim izvorom prehrane dojenčadi (23). Matične i imunološke stanice majke izlaze iz gastrointestinalnog trakta djeteta i funkcionalno se integriraju u organe djeteta (24).

Infekcije za koje se pokazalo da stimuliraju leukocitarni odgovor u majčinom mlijeku uključuju bakterijske, virusne ili gljivične infekcije, bolesti majke kao što su peludna groznica, gripa, stanja dojke (bol u bradavicama, začepljeni kanali ili mastitis), druge

infekcije organa (respiratorne, gastrointestinalni trakt (GIT), infekcije uha ili oka) kao i stanja dojenčadi kao što su gripa i ospice (25). Prehrana majčinim mlijekom povezana je s boljim neurokognitivnim ishodima, akademskim uspjesima i višim IQ (intelligenzquotient) rezultatima u osoba koje su prijevremeno rođene (26–28).

Sullivan i sur. prvi su pokazali da je visoka izloženost majčinom mlijeku nakon prijevremenog poroda povezana s fenotipom kortikalne slike koji više sliči morfologiji mozga kod novorođene djece, ali učinci ovise o duljini dojenja (29).

Istraživanje Hassiotija i sur. pokazalo je da u majčinom mlijeku dolazi do povećanja sadržaja leukocita kao odgovor na infekciju majke i/ili djeteta (30). Infekcije dojke, drugih organa ili opće infekcije majke stimulirale su odgovor leukocita u majčinom mlijeku koji se kretao od 0,7% (bolna dojka) do 93,6% (mastitis) leukocita ukupnih stanica mlijeka (30). Kao što je i očekivano do velikog povećanja broja leukocita u majčinom mlijeku dolazi tijekom upale tkiva dojke (mastitisa), međutim do povećanja broja upalnih stanica u majčinom mlijeku dolazi i tijekom bolesti samo djeteta (30) kada je majka klinički bez simptoma. Nakon oporavka majke i/ili djeteta sadržaj leukocita vraća se na vrijednost prije bolesti. Ovo povećanje leukocita također je bilo popraćeno značajnim promjenama u koncentracijama laktoferina, sIgA (sekretorni imunoglobulin A), IgG i IgM (30,31). Odgovor majke na infekciju novorođenčeta nije potpuno razjašnjen, no smatra se da je retrogradni duktalni protok povezan s izbacivanjem mlijeka tijekom dojenja, put za prijenos patogena porijeklom iz dojenčeta (32). Preko bradavice može doći do lokalne stimulacije imunološkog odgovora u majčinoj mliječnoj žlijezdi (30,33,34).

1.1. Definicija dojenja

SZO je preporučila tri definicije dojenja: isključivo dojenje (ID), pretežito dojenje (PD) i potpuno dojenje.

ID – podrazumijeva hranjenje dojenčadi samo majčinim mlijekom, bilo dojenjem ili hranjenje izdojenim mlijekom bez dodataka bilo koje druge adaptirane mliječne formule (AMF), kašaste ili krute hrane niti vode. U sklopu isključivog dojenja dozvoljena je iznimno prema potrebi primjena lijeka ili vitaminsko mineralnih dodataka.

PD – podrazumijeva hranjenje dojenčadi dojenjem ili izdojenim mlijekom uz dodatak vode, vodenih napitaka, voćnih sokova i vitaminsko-mineralne nadomjeske te prema potrebi lijek. Isključuje primjenu AMF, te druge kašaste ili krute hrane.

Potpuno dojenje – isključivo i pretežito dojenje zajedno. Podrazumijeva dojenje s uvedenom dohranom - dojenče uz majčino mlijeko dobiva krutu ili kašastu hranu ili mliječnu formulu (35).

1.2. Faze laktacije

Kao što je prethodno navedeno, majčino mlijeko se mijenja tijekom dojenja, kako bi se prilagodilo različitim fazama rasta i razvoja dojenčeta, a dodatno se može promijeniti ovisno o zdravstvenom stanju majke i/ili djeteta. Kolostrum je prvo mlijeko koje majke proizvode nakon rođenja, a od prijelaznog i zrelog mlijeka razlikuje se po izgledu, količini i sastavu. Male količine kolostruma proizvode se u prvih nekoliko dana nakon poroda, sadrži dosta zaštitnih tvari, kao što je sIgA, laktoferin, leukociti te epidermalni faktor rasta (36). Budući da sadrži male količine laktoze, a visoke koncentracije imunoloških komponenti to nam govori da je njegova primarna uloga zaštitna, a ne prehrambena (6). Razine natrija i klorida i magnezija su više, a razine kalija i kalcija su niže nego u prijelaznom i zrelog mlijeku (36,37). Prijelazno mlijeko se počinje lučiti nekoliko dana nakon poroda (5-15 dan) i predstavlja pojačanu proizvodnju mlijeka kako bi se zadovoljile prehrambene i razvojne potrebe dojenčeta. Otprilike dva tjedna nakon poroda počinje se proizvoditi zrelo majčino mlijeko. Sastav zrelog mlijeka je relativno stabilan, iako tijekom laktacije u određenim stanjima može doći do njegove promjene (36).

1.3. Korisni učinci dojenja na dijete i majku

1.3.1. Korisni učinci dojenja na dijete

Dojenje ima stimulativni učinak na razvoj obrambenog sustava djeteta, a dokazani su i brojni povoljni učinci na zdravlje djeteta. Djeca koja su dojena manje obolijevaju od upala mokraćnog, probavnog i dišnog sustava. U usporedbi s hranjenjem AMF-om, dojenje je općenito povezano sa smanjenim morbiditetom i mortalitetom u dojenčadi, posebice s nižom učestalošću infekcija GIT te upalnih, respiratornih i alergijskih bolesti (38). Isključivo dojenje

u trajanju od najmanje tri mjeseca povezano je i s manjom učestalošću i težinom proljeva, upala srednjeg uha i infekcija dišnog sustava (39–42). Studije i meta-analize potvrdile su povezanost šest mjeseci isključivog dojenja sa smanjenim stopama infekcija donjih dišnih putova, teškog proljeva, upale srednjeg uha i pretilosti (43). Dojenje je povezano i s manjom učestalošću pretilosti tijekom djetinjstva i adolescencije, kao i s manjom učestalošću hipertenzije i hiperkolesterolemije u odrasloj dobi (1,39). Dojena djeca imaju manji rizik obolijevanja od šećerne bolesti ovisne o inzulinu (22). Majčino mlijeko ima doživotne učinke na zdravlje, i uz to što štiti od nastanka šećerne bolesti, pretilosti, hiperlipidemije, hipertenzije štiti i od autoimunih bolesti i astme (8,14). Dokazano je i da dojenje utječe na dječji mozak, potiče bolji socioemocionalni razvoj djeteta, a povezano je i s poboljšanim rezultatima na testovima inteligencije (44,45). Postoje i brojni dokazi da dojenje štiti od smrti u okruženjima s niskim primanjima, ali dojenje smanjuje smrtnost djece i u zemljama s visokim dohotkom. Studije govore i o smanjenju sindroma iznenadne smrti dojenčadi (SIDS), a meta analiza 4 studije pokazuje 58% smanjenje od pojave nekrotizirajućeg enterokolitisa (NEC) (22,46). Opsežni podaci pokazuju da dojena djeca imaju manju učestalost mnogih akutnih ili kroničnih bolesti, kao što su upala srednjeg uha, akutni proljev, infekcije donjih dišnih putova, sindrom iznenadne smrti dojenčadi, upalne bolesti crijeva, juvenilna leukemija, dijabetes, pretilost, astma i atopijski dermatitis (17,18).

Osamnaest studija pokazuje i da dojenje štiti od pojave leukemije kod djece (47). Svi ovi zaštitni učinci majčinog mlijeka rezultat su brojnih bioaktivnih tvari za koje je dokazano da štite od infekcija, smanjuju upalu, pomažu razvoju imunološkog sustava i povoljno utječu na mikrobiom dojenčadi (48). Postoje sestrinska istraživanja u javnom zdravstvu o korisnim učincima kolostruma i majčinog mlijeka u liječenju konjuktivitisa, ragada, rinitisa, infekcija kože i mekih tkiva (15). Pronalaskom citokina, čimbenika rasta i heterogene populacije stanica, uključujući matične stanice i probiotičkih bakterija dolazi do pojačanog zanimanja istraživača za ljudska majčino mlijeko kao prirodni lijek. Postoji niz izvješća o učinkovitoj topikalnoj primjeni ljudskog mlijeka u liječenju pelenskog osipa, atopijskog ekcema i odvajanja pupkovine (49–51). Ljudsko mlijeko također se preporučuje za prehranu nedonoščadi jer značajno smanjuje komplikacije povezane s prijevremenim porodom kao što su NEC, retinopatija nedonoščadi, bronho-plućna displazija i sepsa s kasnim početkom te potiče razvoj mozga i neurokognitivni ishod (52).

1.3.2. Korisni učinci dojenja na majku

Pouzdanе meta analize pokazuju da žene koje su dojile i koje su dulje dojile manje obolijevaju od raka dojke i jajnika u odnosu na one koje nisu dojile ili su kratko dojile (53,54). Postoji istraživanje koje govori u prilog da manje obolijevaju od raka endometrija (55). Meta analiza šest kohortnih studija ukazuje da dojenje smanjuje i razvoj šećerne bolesti (56). Brži gubitak i vraćanje poželjne tjelesne težine, odnosno smanjivanje indeksa tjelesne mase (ITM) povezano je s dojenjem dužim od 6 mjeseci, gdje se sa svakih 6 mjeseci dojenja ITM indeks smanjuje za 1% (57). Majke djece koja su isključivo dojena 6 mjeseci imaju dugotrajniju laktacijsku amenoreju (58). Dojenje štiti i od razvoja kardiovaskularnih bolesti (30,57). Rani prestanak dojenja ili nedojenje povezani su s povećanim rizikom od postporođajne depresije majke (55,56).

1.4. Hormonska regulacija lučenja majčinog mlijeka

Laktaciju kontroliraju hormoni iz nekoliko endokrinih žlijezda. Normalna funkcija prednjeg režnja hipofize, nadbubrežnih žlijezda i jajnika preduvjet je normalne morfogeneze mliječne žlijezde. Postoje tri skupine hormona koje imaju specifične učinke na mliječne žlijezde. Prva grupa hormona su reproduktivni hormoni - estrogen, prolaktin, placentni laktogen i oksitocin. Njihova se razina mijenja tijekom reproduktivnog razdoblja i direktno djeluju na žljezdano tkivo dojke i priprema je za lučenje mlijeka. Drugu skupinu hormona čine metabolički hormoni: hormon rasta, kortizol, tiroksin, trijodtironin i inzulin čija je osnovna uloga metabolički odgovor na stres i unos hrane, a djeluju i na žljezdano tkivo dojke pripremajući ga za produkciju mlijeka. Treću skupinu hormona čine: prolaktin, hormon rasta i paratiroidni hormon povezan proteinom (PTHrP *od. eng. parathyroid hormone-related protein*) (60).

Razlikujemo tri faze laktacije, a to su mamogeneza, laktogeneza i galaktopoeza.

Mamogenezu obilježava rast dojki odnosno povećanje njihovog volumena u trudnoći koji se događa pod utjecajem placentarnih i lutealnih hormona. Već od 16. tjedna trudnoće može doći do proizvodnje kolostruma, no hipotalamus izlučuje faktor koji inhibira prolaktin (PIF *od engl. prolactin inhibiting factor*) tako da se mlijeko u trudnoći stvara u jako malim količinama (1).

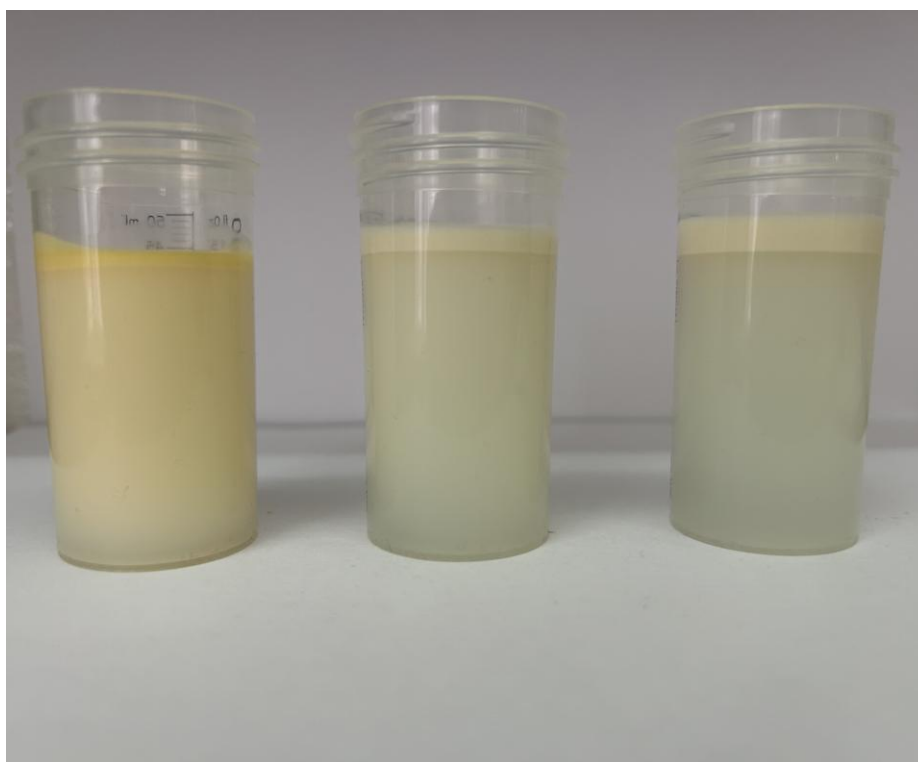
Laktogeneza počinje oko 12. tjedana prije poroda sintezom i sekrecijom mlijeka, a 30 do 40 sati nakon poroda počinju se proizvoditi veće količine mlijeka (61). Porodaj posteljice dovodi do smanjenja razine progesterona, estrogena i humano placentarnog laktogena te posljedično naglog opadanja razine PIF-a (31). Tada nastaje preduvjeti da hipotalamus počinje izlučivati faktor oslobađanja prolaktina (PRF od engl. prolactin releasing factor). PRF u adenohipofizi potiče lučenje prolaktina. Prolaktin je hormon koji potiče stvaranje mlijeka i ispuštanje mlijeka u alveole mliječne žlijezde dojke (1). Tijekom nekoliko sljedećih tjedana bazalna razina prolaktina vraća se na razinu prije trudnoće. Svakim novim podojem razina prolaktina prolazno raste za 10 do 20 puta i ostaje na toj razini oko 60 minuta što omogućava održavanje laktacije i stvaranje mlijeka za sljedeće podoje. Ako dijete doji bez prekida mlijeko se može stvarati i nekoliko godina uz napomenu da mu se količina prirodno smanjuje nakon 7 do 9 mjeseci (62,63). Za izlučivanje mlijeka iz dojki potreban je i hormon oksitocin koji potiče kontrakcije mioepitelnih stanica oko alveola i istiskivanje mlijeka u mliječne kanaliće. Oksitocin djeluje i na raspoloženje majke te potiče kontrakcije maternice i pomaže involuciji maternice. Dojenje je složen proces za čiju normalnu funkciju je važna interferencija endokrinog, perifernog i središnjeg živčanog sustava. Između podoja mlijeko se kontinuirano stvara u mliječnim žlijezdama, ali ono ne istječe u izvodne kanaliće i zato ne kapa iz bradavica (64). Refleks sisanja djeteta važan je za izlazak mlijeka iz dojki. Prilikom dojenja dijete podražuje periferni živac koji inervira areolu i bradavicu i aferentnim putem živčani impuls se prenosi putem kralježnice do središnjeg živčanog sustava u hipotalamusu. Hipotalamus regulira otpuštanje hormona prolaktina iz adenohipofize i oksitocina iz neurohipofize (65). Proces otpuštanja mlijeka može potaknuti i djetetov plač ili samo gledanje djeteta. Mnogi psihogeni čimbenici mogu utjecati na smanjeno lučenje prolaktina i oksitocina i na taj način spriječiti stvaranje i otpuštanje mlijeka (64). Iz tog razloga je bitno dojiljama osigurati mirno okruženje nakon poroda te ukloniti sve negativne čimbenike koji bi mogli negativno utjecati na dojenje. Psihička stabilnost majke potiče refleks otpuštanja mlijeka i time djeluje stimulativno na dojenje, ali i na bolju emotivnu povezanost majke i djeteta (66,67).

Galaktopoeza je proces dugotrajnog održavanja stvaranja, sekrecije i otpuštanja mlijeka iz dojke. Za ovaj proces je važno redovito pražnjenje dojke sisanjem ili izdajanjem jer je to podražaj za izlučivanje prolaktina i oksitocina. Povećanje produkcije mlijeka moguće je samo pražnjenjem dojki češćim podojima ili češćim izdajanjem. Ukoliko se dojke ne prazne dolazi do porasta intermamarnog tlaka koji je poticaj epitelnim stanicama da izlučuju faktor koji

inhibira laktaciju (FIL od engl. *Feedback Inhibitor of Lactation*). FIL koči stvaranje mlijeka i omogućava involuciju žljezdanog tkiva tako što smanjuje sintezu prolaktinskih receptora (1).

1.5. Sastav majčinog mlijeka

Majčino mlijeko se naziva zlatnim standardom prehrane. Ima jedinstveni sastav: 87% ga čini voda, a ostatak su makro i mikronutrijenti - 7% ugljikohidrati (uglavnom laktoza), 4% lipidi i 1% bjelancevine i ostalo (vitamini i minerali) (68). Majčino mlijeko je složena tekućina koja je sastavljena od nekoliko faza koje se prilikom centrifugiranja mogu razdvojiti na sloj masti, vodenu fazu i pelet. Slika br.1.1. prikazuje razdvajanje faza mlijeka na vodeni i masni dio. U peletu se nalaze mliječne stanice koje su mješavina stanica majčinog mlijeka koje čine leukociti, epitelne stanice, matične stanice i bakterije. Biokemijski sastav majčinog mlijeka prikazan je u tablici br.1.1, kao i razlika biokemijskog sastava između kolostruma i zrelog mlijeka.



Slika 1.1. Razdvajanje mlijeka na sloj masti i vodenu fazu

Izvor slike: autorski rad. Prva bočica je kolostrum, s lijeva na desno prikazan je kolostrum, prijelazno mlijeko i zrelo mlijeko.

Tablica 1.1. Biokemijski sastav majčinog mlijeka, razlike kolostrum vs. zrelo mlijeko

Sastav \ Mlijeko	Kolostrum	Zrelo mlijeko
Voda	87,2%	87,5%
Ugljikohidrati	5,7%	7,1%
Mliječna mast	2,9%	3,5-4,5%
Kolesterol (mg/100 mL)		20
Bjelančevine	2,3%	1,1%
Sirutka: kazein (%)		60:40
Minerali	0,3%	0,2%
Željezo/100 mL	0,09 mg	0,05 mg
Kalcij/100 mL	48 mg	33 mg
Fosfor/100 mL	16 mg	14 mg
Natrij/100 mL	48 mg	17 mg
Kalorije/100 mL	58	68

1.6. Prilagodba majčinog mlijeka potrebama djeteta u zdravlju i bolesti

Sastav humanog mlijeka prilagođava se potrebama djeteta i različit je kod nedonoščadi u odnosu na terminsko rođeno dijete, ovisi je li prvo ili zadnje mlijeko te radi li se o kolostrumu, prijelaznom ili zreloom mlijeku (69). Sastav mlijeka se razlikuje među ženama, a mijenja se i tijekom jednog podoja. Na početku podoja prvo mlijeko sadrži male količine masti i ima veći udio laktoze što zadovoljava djetetovu žeđ, no udio masti se povećava tijekom trajanja podoja kako bi se zadovoljile i prehrambene potrebe djeteta. Suprotno tome, sastav ugljikohidrata i bjelančevina ne mijenja se značajnije tijekom trajanja podoja. Kolostrum ima mali udio masti (10%), ali je bogat bjelančevinama, osobito IgA i laktoferinom koji pomažu u sprečavanju nastanka infekcija (18,70).

Sastav humanog mlijeka može varirati ovisno i o uvjetima obrade kao što su skladištenje i pasterizacija. Sastav humanog mlijeka mijenja se i tijekom trajanja laktacije, prilagođava se potrebama djeteta koje raste da bi moglo zadovoljiti djetetove potrebe za hranom i tekućinom. Osim toga ovisi o prehrani majke, njenom zdravlju te izloženosti okolišu (18). Istraživanje sastava mlijeka majki s prekomjernom težinom u odnosu onih s normalnom težinom pokazalo je da mlijeko majki s prekomjernom tjelesnom težinom ima više masti i bjelančevina i niži

sadržaj ugljikohidrata u nekim vremenskim točkama laktacije u usporedbi s mlijekom majki s normalnom tjelesnom težinom (18).

Poznato je da i u uvjetima kada dojilje nemaju odgovarajući nutritivni status, one mogu proizvesti dovoljnu količinu i visokokvalitetno mlijeko, no to može dovesti do iscrpljivanja majčinih rezervi. Postoji mnogo čimbenika koji utječu na sastav ljudskog mlijeka. S obzirom na važnu ulogu majčine prehrane tijekom dojenja, još uvijek je u tijeku rasprava o potrebi dodavanja dodataka prehrani tijekom dojenja. Ona ovisi o nekoliko čimbenika, kao što su socioekonomski status ili prehrambene navike majke. Na primjer, u niskim socioekonomskim uvjetima, suplementacija se pokazala učinkovitom strategijom za rješavanje nedostataka u prehrani (71).

U razvijenim zemljama suplementacija se najčešće odnosi na dugolančane polinezasićene masne kiseline (PUFA) uglavnom n-3 masne kiseline za koje se smatra da su povezane s boljim zdravljem novorođenčadi, kao što su pokazali Valentine i sur. (72). Pretpostavili su da suplementacija dokosaheksaenoičnom kiselinom (DHA) kod majki smanjuje upalne markere kod dojenčadi (72,73).

Studija Karbasi i sur. je pokazala da majke koje doje, a konzumirale su veću količinu zelenog povrća, te drugog povrća i voća imaju višu količinu antioksidansa u mlijeku (74).

Nadalje studija u kojoj su kontroliranim intervencijama prehrane dojilje kratkotrajno uzimale hranu bogatu šećerima i/ili mastima uzrok su znatnih promjene u sastavu njihova mlijeka. Kod tih majki došlo je do promjena triglicerida, kolesterola, bjelančevina i laktoze u majčinom mlijeku. Varijacije uočene u proteinima majčinog mlijeka i laktozi tijekom razdoblja od 12 sati ukazuju na cirkadijalni ritam (75). Primijećene su značajne pozitivne korelacije između majčinog unosa linolne kiseline, alfa lipoične kiseline (ALA), DHA, monozasićene masne kiseline (MUFA) i PUFA i njihovog sadržaja u ljudskom mlijeku (75).

Dugo godina je poznato da majčino mlijeko osim hranjivih tvari sadrži stanične komponente. Kolostrum i zrelo majčino mlijeko sadrže različite vrste stanica, uključujući zrele epitelne stanice, progenitorske stanice, matične stanice i leukocite (76). Novija otkrića pokazuju da je majčino mlijeko heterogenije nego što se godinama mislilo te predstavlja potencijalno važan izvor matičnih stanica (77,78). Najranija istraživanja iz prošlog stoljeća izdvojila su leukocite kao najzastupljenije imunološke stanice u majčinom mlijeku, pri čemu se uglavnom ispitivao

kolostum i prijelazno mlijeko te se nije obraćala pozornost na zdravstveno stanje majke i djeteta.

Kolostrum sadrži veliki broj imunoloških stanica i tako se prilagođava većim imunološkim potrebama dojenčadi u prvim danima života. Dva tjedna nakon poroda broj imunoloških stanica u mlijeku pada na nisku razinu od 0-2% ukupnih stanica koja je stabilna kada su majka i dijete zdravi (30). Stanični sadržaj humanog mlijeka je otprilike od 10 000 do 13 000 000 stanica/ml, pri čemu 0,1% imunoloških stanica odgovara 10 do 13 000 imunoloških stanica/ml mlijeka (34). Riskin i sur. u svojoj studiji su dokazali da povišena tjelesna temperatura kod dojenčadi potiče odgovor imunoloških stanica majčinog mlijeka, koje se nakon oporavka vraćaju na normalnu razinu (79). Imunološke stanice u majčinom mlijeku brzo reagiraju na infekcije majke i djeteta što nam potvrđuje važnu ulogu dojenja u zaštiti dojenog djeteta. Osim toga, ljudsko mlijeko sadrži epitelne stanice, matične, faktor rasta te bakterijske stanice (80).

1.7. Nestanične nutritivne komponente majčinog mlijeka

Brojna istraživanja koja su provedena na sastavu majčinog mlijeka koristila su različite metode prikupljanja, skladištenja i testiranja mlijeka. Zlatni standard prikupljanja mlijeka podrazumijevalo bi prikupljanje cjelokupnog mlijeka tijekom 24 sata, prikupljanje u više navrata tijekom vremena od istih osoba. Budući da je ovakav način dosta skup i zahtjevan preporuke su da se mlijeko prikuplja za određeno testiranje uvijek u isto doba dana, da se prazni cijela dojka i to ona na koju dijete nije dojilo 2-3 sata te prikupljanje u više navrata od iste osobe (36). Različite rezultati pojedinih studija ovise i o skladištenju mlijeka do testiranja (pasterizacija, zamrzavanje). Toplinska obrada ljudskog mlijeka smanjuje antiinfektivna svojstva, stanične komponente, faktore rasta i hranjive tvari (81). Sastav majčinog mlijeka je složen i pod utjecajem mnogih čimbenika kao što je doba dana, vrijeme od posljednjeg hranjenja i prehrana majke (82). Studije na ljudima pokazale su da mnogi čimbenici poput geografije, spola djeteta ili broja trudnoća utječu na heterogenost i sastav majčinog mlijeka (6,83).

Humano mlijeko sadrži oko 87%–88% vode, ima specifičnu težinu od 1,030, osmolarnost od oko 286 mOsm/L i 124 g/L čvrstih komponenti kao makronutrijenata, uključujući oko 7% (60–70 g/L) ugljikohidrata, 1% (8-10 g/L) proteina i 3,8% (35-40 g/L) masti (18). Zrelo mlijeko

sadrži 65-70 kcal na 100 mL energije, a oko 50% ukupne zalihe kalorija čine masti, a 40% su ugljikohidrati (36). Sastav makronutrijenata razlikuje se između prijevremenog i terminskog mlijeka, pri čemu mlijeko kod prijevremenog poroda ima više proteina i masti.

Studija u Kaliforniji ispitivala je povezanost između karakteristika majke i sastava makronutrijenata u majčinom mlijeku te je utvrdila da je četiri mjeseca nakon poroda koncentracije makronutrijenata u majčinom mlijeku povezana s nekim od čimbenika kao što su: tjelesna težina i visina majke, unos proteina, paritet, povratak menstruacije i učestalost dojenja. Isto tako studija je utvrdila da majke koje proizvode veće količine mlijeka obično imaju niže koncentracije masti i proteina u mlijeku, ali veće koncentracije laktoze (36,84).

1.7.1. Voda

U gotovo svih sisavaca na svijetu voda čini najveći udio u sastavu mlijeka, ukupno 87,5%. Svi ostali sastojci su otopljeni u vodi. Voda pomaže i u regulaciji održavanja topline novorođenčeta. Dojilje stoga imaju potrebu povećanog unosa vode. Ukoliko je smanjen unos vode, organizam osigurava vodu za stvaranje mlijeka na način da smanjuje izlučivanje vode putem urina i smanjuje gubitak putem drugih neosjetnih gubitaka. Tijekom vrućih mjeseci, i u najtoplijim područjima življenja potreba dojenčeta za vodom u potpunosti se može zadovoljiti vodom u mlijeku (85).

1.7.2. Masti

Masti su druga najzastupljenija makromolekula u majčinom mlijeku i najvažnija je za rast dojenčeta i razvoj središnjeg živčanog sustava (85). Dugolančane polinezasićene masne kiseline (LCPUFA) koje se isporučuju kroz majčino mlijeko utječu na razvoj retine i korteksa mozga dojenčadi (4). Lipidi u humanom mlijeku su promjenjivi te se razlikuju od žene do žene, kao i ovisno o dobi dana, a povećavaju se i tijekom dojenja (56). Masnoće majčinog mlijeka su najvarijabilniji sastojak majčinog mlijeka, pa tako zadnje mlijeko sadrži dva do tri puta više masti nego prednje mlijeko (86). Mlijeko proizveden nakon rođenja, sadrži 15-20 g/L masti, postupno se povećava s laktacijom i doseže 40 g/L u zreom mlijeku. Profil masnih kiselina mlijeka ne mijenja se tijekom jedne laktacije unatoč tome što se sadržaj masti povećava 2-3 puta od prednjeg mlijeka do stražnjeg mlijeka (86). Masti osiguravaju 50%

energije dojenčeta (87). Majke koje proizvode veće količine mlijeka obično imaju niže koncentracije masti u mlijeku, ali veće koncentracije laktoze (36). Sastav masti majčinog mlijeka je vrlo heterogen, a sadrži veliku količinu palmitinske i oleinske kiseline. Istraživanja pokazuju i da je udio masti u mlijeku u noćnim i jutarnjim satima niži u odnosu s onim u poslijepodnevnim i večernjim satima (88). Profil masnih kiselina u ljudskom mlijeku varira u odnosu na majčinu prehranu, posebno u LCPUFA (18,36).

1.7.3. Bjelančevine

Proteini su treća čvrsta tvar po zastupljenosti u majčinom mlijeku koji ne samo da osiguravaju ključne aminokiseline nezamjenjive za rast, već i bioaktivne proteine i peptide neophodne za mnoge funkcije (89). Četiri glavne funkcije proteina u majčinom mlijeku su: imunološka zaštita, pomaganje probavnih funkcija, razvoj crijeva i prijenos drugih hranjivih tvari. Majčino mlijeko sadrži preko 400 različitih bjelančevina koje imaju prehrambenu i zaštitnu ulogu. Bjelančevine u mlijeku dijelimo u tri skupine: kazeini, bjelančevine sirutke i mucin (90). Proteini sirutke su α -laktalbumin, laktoferin, sIgA, serumski albumini lizozim. U humanom mlijeku prisutne su tri vrste kazeina α - i β - i κ -kazei (43). U majčinom mlijeku prisutno je približno 13% kazeina i to je najniža koncentracija kazeina od svih proučavanih vrsta što odgovara sporom rastu ljudske dojenčadi. Kazein i većina proteina sirutke u mlijeku se koriste za rast djeteta. Koncentracije kazeina i sirutke značajno se mijenjaju tijekom laktacije. Tijekom prva dva tjedna laktacije koncentracije proteina sirutke su vrlo visoke, dok su koncentracije kazeina niske, što rezultira omjerom sirutka - kazein čak 80:20. Omjer pada na 65:35 od 2. tjedna i ostaje konstantan na oko 60:40 nakon toga (91). Neproteinski spojevi koji sadrže dušik, uključujući ureu, mokraćnu kiselinu, kreatin, kreatinin, aminokiseline i nukleotide, čine približno 25% dušika u ljudskom mlijeku. Razina proteina smanjuje se u majčinom mlijeku tijekom prvih 4 do 6 tjedana života bez obzira na vrijeme poroda. Na koncentraciju bjelančevina u ljudskom mlijeku ne utječe prehrana majke, ali se povećava s tjelesnom težinom majke u odnosu na visinu, a smanjuje se u majki koje proizvode veće količine mlijeka (9).

1.7.4. Ugljikohidrati

Mlijeko sadrži također različite vrste ugljikohidrata, pretežito laktozu, disaharid jedinstven za mlijeko, te glukozu, galaktozu i oligosaharide, koji pokazuju značajan zaštitni učinak protiv raznih patogena (52). Osim nutritivne vrijednosti, ugljikohidrati imaju i važnu ulogu u razvoju GIT. Oligosaharidi humanog mlijeka važna su komponenta ugljikohidrata ljudskog mlijeka i treća su najvažnija komponenta u humanom mlijeku s ukupno 12,9 g/L u zreom mlijeku, što je manje u odnosu na rani postpartalni period kada primjerice treći dan poslije poroda majčino mlijeko prosječno sadrži 20.9 g/L oligosaharida (92). Oligosaharidi humanog mlijeka djeluju kao prebiotici, potiču rast dobrih bakterija unutar probavnog trakta dojenčeta i na taj način štite dojenče od kolonizacije patogenih bakterija (2). Osim toga oni imaju važnu ulogu u prevenciji neonatalnih proljeva i infekcija dišnog sustava (93).

1.7.5. Mikronutritijenti

Zastupljenost mikronutritijenata, uključujući vitamina A, B1, B2, B6, B12, D i joda u majčinom mlijeku varira ovisno o majčinoj prehrani i tjelesnim zalihama. Budući da prehrana dojilja nije uvijek optimalna preporuke su uzimanja multivitaminskih pripravaka tijekom dojenja (94). Koncentracija vitamina K u majčinom mlijeku je jako niska bez obzira na majčinu prehranu te je stoga preporuka i praksa da se u svrhu prevencije hemoragijske bolesti novorođenčeta djeci u rodilištu parenteralno daje vitamin K. Budući da je i vitamin D zastupljen u malim količinama u majčinom mlijeku, osobito ako majke nisu izložene suncu, SZO preporuča oralnu suplementaciju vitamina D.

1.8. Nestanične bioaktivne sastavnice majčinog mlijeka

Bioaktivne sastavnice u majčinom mlijeku dolaze iz raznih izvora, neke proizvode izlučuje epitel dojke, neke proizvode stanice koje se prenose u mlijeku (95). Majčino mlijeko je bogato proteinima čija uloga nije primarno nutritivna. Među njima se ističu imunoglobulini čija je primarna funkcija zaštita dojenčeta od mikroorganizama i razvoja infekcije. Mlijeko sadrži aktivne i neaktivne oblike hidrolitičkih enzima, uključujući proteolitičke enzime (96).

1.8.1. Imunoglobulini

Imunoglobulini daju pasivnu imunost dojenčadi prenatalno preko placente i postnatalno dojenjem. Razlikujemo 5 razreda imunoglobulina, a to su IgA, IgG, IgM, IgE i IgD. Jedini razred imunoglobulina koji prelazi placentu je IgG. Prijelaz molekula razreda IgG iz majčinog mlijeka u submukozu crijeva dojenčeta nije pasivan već se odvija putem specifičnog Fc receptora (16). Slični receptori tzv. neonatalni Fc receptori (FcRn) se mogu naći i u crijevu novorođenčeta gdje posreduju absorpciju majčinih imunoglobulina. Zaštitu od razgradnje kod prijenosa Ig upravo omogućuje vezanje za FcRn. Trajanje ekspresije FcRn u neonatalnom razdoblju je različito kod različitih vrsta sisavaca, a kod ljudske dojenčadi se događa najranije.

Prisutnost ovog receptora na površini fetalnog eritrocita zaslužen je i za in utero transport IgG iz amnionske tekućine u krv fetusa (97). U novorođenčadi se FcRn eksprimira na luminalnoj površini enterocita samo nekoliko sati ili dana nakon rođenja. Unatoč tome, FcRn ostaje cijeli život na kontra-luminalnoj površini tih stanica i pomaže u transportu Ig, uključujući sIgA, iz submukoze i krvi na površine sluznice (16).

Glikozilacija majčinog IgG razvija se tijekom gestacijskog razdoblja, a vjerojatno i tijekom dojenja (98). Zbog toga postoji mogućnost prijenosa IgG iz majčinog mlijeka na dojenče koji onda doprinosi protuupalnom mikrookruženju na površini crijeva novorođenčeta, a tako i neonatalnom sazrijevanju i regulaciji imunološkog odgovora.

Iako su svi razredi imunoglobulina pronađeni u ljudskom mlijeku, najzastupljeniji sIgA, a zatim sekretorni IgG (sIgG) (99,100).

Sekretorni IgA služi kao prva linija obrane u crijevima jer se samo djelomično probavljaju u želucu dojenčadi, odnosno većina ih ostaje intaktna i na taj način štiti donji dio probavnog trakta od bakterija, virusa i toksina (101). Razine sIgA u humanom mlijeku se smanjuju tijekom prvih 12 tjedna nakon rođenja, pri čemu je najznačajnije smanjenje tijekom prvog tjedna (41). Istraživanja su pokazala da zdravstveno stanje majke značajno utječe na razinu sIgA u humanom mlijeku. Niže razine sIgA u mlijeku povezana su s gestacijskim dijabetesom, postporođajnim stresom i depresijom (102–104). Osim toga, na razinu imunoglobulina u mlijeku utječe i razdoblje laktacije te status cijepljenja. Istraživanje na majkama iz Bangladeša cijepljenim protiv virusa koji uzrokuje influencu A pokazala su značajno više koncentracije specifičnih, virus-neutralizirajućih IgA u ljudskom mlijeku u

usporedbi s majkama koje nisu cijepljene (105). Nadalje, isključivo dojenje u prvih 6 mjeseci života značajno je smanjilo broj febrilnih respiratornih bolesti dojenčadi, što govori o zaštitnim svojstvima ovih mliječnih antitijela (105).

IgG je osnovni imunoglobulin u serumu i važan je za dugotrajni imunitet. On aktivira kaskadu komplementa za uklanjanje patogena i neutralizira virusne infekcije na razini sluznice. U humanom mlijeku razine IgG su niske, ali se s vremenom povećavaju. Razina IgG u humanom mlijeku majki koje isključivo doje je veća u usporedbi s onima koje isključivo ne doje svoju djecu (106). Stoga IgG humanog mlijeka igra važnu ulogu u smanjenju infekcija kod dojenčadi. Dosadašnje studije su bile usredotočene na učinak cijepljenja majki tijekom trudnoće na koncentracije IgG i IgA u ljudskom mlijeku za pertusis, pneumokok, influencu i meningokok (107), s ograničenom procjenom utjecaja ovih protutijela na stope specifičnih infekcije kod dojene dojenčadi.

IgM se prenosi na dojenčad putem mlijeka. Za razliku od IgG, razine IgM ne variraju u majčinom mlijeku koje isključivo doje u odnosu na one koje isključivo ne doje (106). Zanimljiv je i nalaz da se kod terminski rođene djece IgM djelomično probavlja dok se kod nedonešene djece ne probavlja i dospijeva u distalnije dijelove probavnog trakta (108). IgM također štite dojenčad od virusnih i bakterijskih infekcija.

Protutijela razreda IgE primarno štite od infestacije parazitima. Međutim, kako u serumu tako i u majčinom mlijeku pronađena su protutijela usmjerena na antigene parvovirusa B19 koja vjerojatno sudjeluju u zaštiti dojene djece od infekcije parvovirusom B19 (109). Osim toga, postoje istraživanja koja pokazuju da IgE štiti i od progresije infekcije virusom humane imunodeficijencije 1 (HIV) (110,111). Imunoglobulin razreda IgD je izražen na površini zrelih B limfocita gdje djeluje kao B-stanični receptor prepoznavajući antigene bakterija i drugih mikroorganizama te posredujući aktivaciju B stanica (112). Koncentracije IgA, sIgA, IgG i IgM znatno su više u svježem humanom mlijeku u usporedbi s donorskim (108). Razlog tome je što donirano mlijeko prolazi Holder pasterizaciju i obično se uzima od majki čija su djeca u dobi od nekoliko mjeseci.

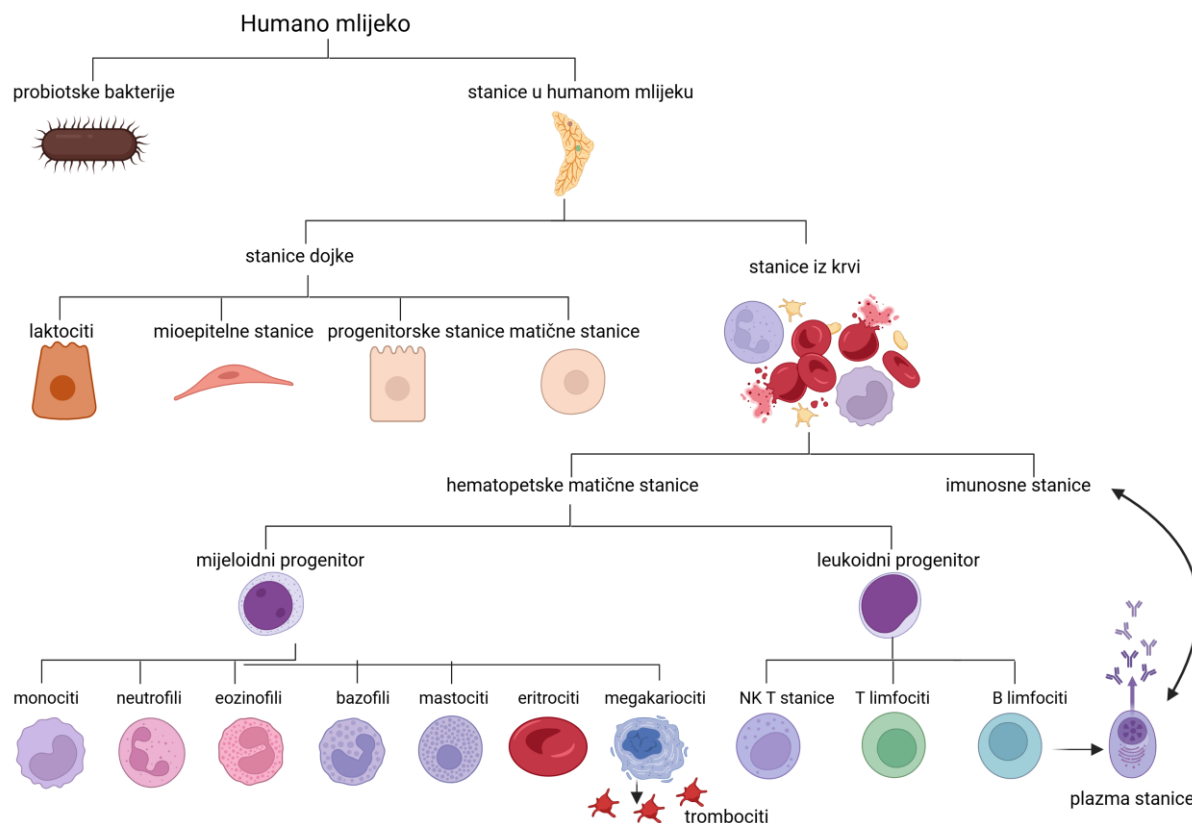
1.8.2. Ostali bioaktivni faktori

Majčino mlijeko sadrži brojne bioaktivne faktore uključujući i mikroorganizme koji čine mikrobiotu ljudskog mlijeka (HMM). Istraživanja su pokazala da uz bakterije u HMM-u su

prisutni i virusne i gljivične komponente. Najvažniji izvori pojave HMM-a u mlijeku objašnjeni su kao retrogradni tok i entero-mamarni put (113). Čimbenici koji mogu utjecati na njegov sastav su: indeks tjelesne mase majke, prehrana majke, upotrebe antibiotika, tjedan gestacije i vrste poroda te načina dojenja (113,114). HMM je važan čimbenik gastrointestinalne kolonizacije u djece, mikrobna disbioza može biti uzrok razvoja NEC-a, osobito u nedonoščadi, te za pojavu kroničnih bolesti, poput astme i pretilosti, kasnije u životu (115).

1.9. Stanične komponente majčinog mlijeka

Majčino mlijeko sadržava i manju, ali vrlo važnu staničnu komponentu, koja uključuje probiotičke bakterije, matične stanice i imunološke stanice. Sastav imunoloških stanica je prikazan na slici broj 1.2. Metode analize mlijeka putem višebojne protočne citometrije pružaju vrhunsku identifikaciju svih stanica majčinog mlijeka. Dokazano je da leukociti čine samo malu manjinu (<2%) stanica u zrelom mlijeku zdrave majke (30). Trend i sur. otkrili su da su glavni prisutni leukociti u mlijeku mijeloidni prekursori (9-20%), neutrofili (12-27%), nezreli granulociti (8-17%) i necitotoksične T-stanice (6-7%). Napredovanje laktacije povezano je sa smanjenjem glavne koncentracije leukocita CD45⁺, eozinofila, prekursora mijeloidnih i B stanica te CD16⁻ monocita (116). Dokazano je i da majčino mlijeko sadrži matične i progenitorske stanice (77). Nekada se mislilo da je ljudsko mlijeko sterilna tekućina no prije dvadesetak godina otkriveno je postojanje mikrobioma ljudskog mlijeka. Procjene govore da bi dojenče koje se hrani 800 ml majčinog mlijeka dnevno moglo unijeti 10⁷ – 10⁸ bakterijskih stanica dnevno (117).



Slika 1.2. Stanice prisutne u majčinom mlijeku

Izvor slike: autorski rad, kreirano pomoću BioRender programskog alata

1.9.1. Leukociti

Leukocite u ljudskom kolostrumu prvi je uočio 1841. godine biolog Alexander Donné, koji je napravio prvu fotografiju tih stanica. Više od 100 godina kasnije, Smith i Goldman, ispitujući ostatke nakon centrifugiranja kolostruma, ponovno su otkrili da je kolostrum prepun živih leukocita (98). Od tada su stanice ljudskog mlijeka opsežno proučavane.

Tijekom 60-ih godina prošlog stoljeća po prvi puta je otkriveno da je ljudsko mlijeko bogato leukocitima te se tada smatralo da su to najbrojnije stanice. Međutim, rezultati recentnih istraživanja su pokazali da leukociti čine manjinu (<2%) stanica u zrelom mlijeku zdrave majke (30). Leukociti primarno osiguravaju aktivnu imunost i potiču razvoj imunokompetencije u dojenčeta, ali je također vjerojatno da štite mliječnu žlijezdu od infekcija (19). Sadržaj leukocita u kolostrumu varira u žena od ~13,2% do 70,4% ukupnih stanica dok prijelazno i zrelo mlijeko karakterizira vrlo nizak sadržaj leukocita kada su i

majka i dojenče zdravi (30,34). Leukociti migriraju u dojku limfnim žilama i sustavnom cirkulacijom (25).

Intenzivne studije na ljudskom mlijeku pokazale su da, slično krvi, leukociti u mlijeku sadrže različite podtipove uključujući granulocite i mononuklearne leukocite kao što su limfociti, monociti i makrofagi (18,90). Leukociti u majčinom mlijeku daju djetetu aktivan imunitet, pomažu u razvoju vlastitog imunološkog sustava i izravno se bore s patogenima. Postoje studije na životinjama koje dokazuju da leukociti iz majčinog mlijeka mogu preživjeti prolazak kroz probavni trakt dojenčeta te se premjestiti iz probavnog trakta u krvi i udaljena tkiva kao što su limfni čvorovi, slezena i jetra putem sistemske cirkulacije (116,118,119). Leukociti majčinog mlijeka su se pokazali kao aktivirani, pokretni i interaktivni (30,120). Najveće koncentracije leukocita u majčinom mlijeku javljaju se u prvim danima laktacije ($1-3 \times 10^6$ /mL) (121). Majke isključivo dojene djece imaju veći početni broj leukocita u majčinom mlijeku nego one koje ne hrane djecu isključivo majčinim mlijekom (30).

1.9.2. Netrofili i makrofagi

Neutrofili koje nazivamo i polimorfonuklearni leukociti su najbrojniji leukociti u krvi. Prilikom odgovora na infekciju uslijed aktivacije najprije prirođenog, a potom i stečenog imunološkog odgovora te lučenja proupalnih citokina poput interleukina 1 (IL1) i interleukina 6 (IL6) dolazi do proliferacije neutrofila i njihove mobilizacije iz koštane srži. Neutrofili prvi odgovaraju na većinu infekcija, osobito one čiji su uzročnici bakterije i gljivice. Prateći signale citokina i kemokina preleze u ekstravaskularni prostor na mjestu infekcije ili oštećenja tkiva gdje djeluju kao fagociti te imaju sposobnost ingestije mikroorganizma. U tkivima preživljavaju samo nekoliko sati, tako da oni pružaju rani odgovor na infekciju, ali ne osiguravaju dugotrajnu zaštitu (122). Monocita ima u krvi manje nego neutrofila.

Monociti čine jednu komponentu "mononuklearnog fagocitnog sustava" (MPS), koji dijele s makrofagima i konvencionalnim dendritskim stanicama (cDC) (123).

Monociti su definirani kao cirkulirajuće krvne stanice koje čine ~10% perifernih leukocita kod ljudi i ~4% kod miševa. Krvni monociti se razvijaju u koštanoj srži odrasle osobe iz zajedničkog mijeloičnog progenitora (CMP) koji se dijeli s eritrocitima, trombocitima, cDC i granulocitima (124).

Passlick i sur. su 1989 prvi put identificirali diskretne populacije monocita morfologijom i diferencijalnom ekspresijom CD14 i CD16 kod ljudi (125).

Danas se zna da se monociti sastoje od višestrukih podskupova nastalih kroz različite razvojne putove. Oni u homeostatskim uvjetima bivaju nakupljeni u perifernim rezervoarima. Tijekom bolesti monociti imaju zaštitnu funkciju, a mogu razviti i regulatorna svojstva za popravak tkiva. Monociti koji su regrutirani tijekom upale funkcionalno se često razlikuju od rezidentnih makrofaga ili uobičajenih dendričnih stanica (124).

Tkivni makrofagi imaju nekoliko bitnih uloga u zaštiti od mikroorganizama: ingestija i ubijanje mikroorganizama, ingestija mrtvih stanica domaćina, stanica koje odumiru u tkivima i neutrofila koji se nakupljaju na mjestu zaraze. Aktivirani makrofagi izlučuju citokine koji potiču dolazak većeg broja monocita i leukocita na mjesto zaraze, a služe i kao predočne stanice koje predočuju antigene limfocitima T i aktiviraju ih, pokrećući time stečeni krak imunosti. Zanimljiva je uloga makrofaga u popravku oštećenog tkiva, između ostalog, potiče i neoangiogenezu (126).

Makrofazi doprinose različitoj fazi remodeliranja mliječnih žlijezda tijekom razvoja, trudnoće i laktacije (127). Neutrofili i makrofagi su dominantni leukociti u ljudskom mlijeku. Obje vrste stanica su prepune globula mliječne masti i drugih membrana koje fagocitiraju (121).

1.9.3. Limfociti

Limfociti su stanice sa receptorima specifičnim za razne antigene i zato su glavni medijatori stanične i humoralne imunosti (122). Limfocite dijelimo u dvije glavne skupine - limfocite T i limfocite B. Oni se morfološki ne razlikuju, ali imaju potpuno različite imunosne funkcije. Zastupljenost T stanica i B stanica među limfocitima u početnom ljudskom mlijeku je 83%, T limfocita odnosno 6% B limfocita (128). Limfociti T nastaju iz svojih prekursora u timusu, dok limfociti B u sisavaca sazrijevaju u fetalnoj jetri, a kod odraslih jedinki u koštanoj srži. Treća skupina limfocita su prirodno ubilačke (NK od engl. "*natural killer*"). NK stanice nastaju u primarnim limfnim organima i migriraju u krvotok, periferne limfne organe i tkiva, žive različito dugo vrijeme, ponekad i više godina, pa i cijeli ljudski vijek.

Limfociti, kao i ostale stanice, sadrže brojne površinske molekule (biljege) koji se danas mogu prepoznati monoklonskim antitijelima i na osnovu kojih možemo razlikovati njihove

skupine, pa postoji i posebna nomenklatura nazvana CD-sustav (CD - *od engl. "cluster designation"*). On se zasniva na prepoznavanju membranskih biljega monoklonskim antitijelima, a dosad je identificirano >300 CD molekula. Ti se biljezi obično svrstavaju prema podacima koje mogu pružiti o stanici, pa razlikujemo biljege karakteristične za određenu liniju stanica (npr. samo limfociti T na svojoj površini imaju biljeg CD3), diferencijacijske biljege koji su izraženi privremeno u određenom razdoblju sazrijevanja stanice (npr. CD1 na nezrelim limfocitima u timusu) i aktivacijski biljezi, izraženi samo na stanicama aktiviranim antigenom (npr. CD25 koji je receptor za interleukin 2) (129). Svaki limfocit prepoznaje specifični antigen preko površinskog T staničnog receptora (TCR *od engl. T cell receptor*) i B staničnog receptora (BCR *od engl. B cell receptor*). Osobitost imunološkog sustava je mogućnost preslagivanja V(D)J segmenata gena čime se postiže ogromna heterogenost T staničnog receptora, odnosno širok repertoar za prepoznavanje stranih antigena (129). Dodatna važna osobina imunološkog sustava kod čovjeka je spregnuto prepoznavanje što pretpostavlja da se prepoznavanje antigena od strane T limfocita događa samo u slučaju da je isti predodčen na površini tzv. antigen predodčavajućih stanica u sklopu molekula tkivne podudarnosti (MHC *od engl. major histocompatibility complex*) (129).

1.9.4. T limfociti

U prošlosti su se limfociti T prepoznavali po nazočnosti površinskog receptora za ovčje eritrocite (biljeg CD2), a danas se definitivnim biljegom svojstvenim limfocitu T podrazumijeva njegov receptor za antigen, TCR je heterodimer sastavljen od dva polipeptidna lanca na temelju kojih razlikujemo dvije vrste TCR-a – TCR2 koji sadrži α i β lanac i prisutan je na površini većine (90-95%) limfocita T te TCR1 koji je slične građe, ali sastavljen od lanaca γ i δ i nalazi se na površini preostalih 5-10 % limfocita T (129). Oba su receptora povezana s kompleksom sastavljenim od pet polipeptida, koji čine biljeg CD3. S obzirom na dodatne površinske biljege razlikuju se dvije velike subpopulacije limfocita T. U perifernoj krvi njih oko dvije trećine nosi biljeg CD4 i odgovara tzv. pomagačkim T limfocitima (Th *od engl. T helper cells*), a otprilike jedna trećina biljeg CD8 i odgovara tzv. citotoksičnim T limfocitima (Tc *od engl. cytotoxic T cells*).

1.9.5. B limfociti

U perifernoj krvi čovjeka ima 5-15% B limfocita, a prepoznaju se prvenstveno po nazočnosti površinskih imunoglobulina. Prisutni su u koštanoj srži, slezeni, limfnim čvorovima te limfatičnom tkivu sluznica. Limfociti B sami proizvode spomenute imunoglobuline, koji se potom ugrađuju u staničnu membranu, gdje djeluju kao specifični receptori za antigen (BCR engl. "B-cell antigen receptor"). Većina ljudskih limfocita B nosi membranski IgM i IgD, a samo manjina imunoglobuline preostalih razreda IgG, IgA i IgE, premda na određenim mjestima u tijelu i takve stanice postoje u većem broju; npr. u sluznici crijeva pretežu limfociti B s površinskim IgA. Na površini limfocita B postoje i brojni drugi biljezi, pa većina zrelih stanica posjeduje antigene MHC-II važne za suradnju s limfocitima T, receptore za komponente komplementa C3b i C3d (CR1 i CR2), receptore za Fc-fragment imunoglobulina G (FcγRII) i površinske biljege poput CD19, CD20 i CD22 (129).

1.9.6. Prirodnoubilačke (NK od engl. "natural killer") stanice

Prirodne stanice ubojice igraju ključnu ulogu u prvoj liniji obrane urođenog imunološkog sustava. Izraz prirodni ubojica odražava sposobnost ovih stanica da ubiju ciljane stanice bez prethodne stimulacije.

U perifernom krvnom optoku čovjeka čine oko 15 % limfocita, a od stanica T i B se, između ostaloga, razlikuju i po tome što ne posjeduju receptore za antigene TCR i BCR. Od površinskih biljega obilježava ih prvenstveno prisutnost biljega CD16 (receptor za Fc fragment IgG, FcγRIII) i CD56 (adhezijska molekula) (130,131). Veći dio stanica NK se i morfološki razlikuje od glavnine limfocita T i B po sljedećim obilježjima - veći su, imaju razmjerno više citoplazme, jezgra nije okrugla već je na jednom dijelu spljoštena, a u citoplazmi postoje azurofilna granula po čemu se ove stanice nazivaju i velikim granuliranim limfocitima. Dio autora smatra da NK stanice ne spadaju u populaciju limfocita, već predstavljaju zasebnu populaciju stanica koja se s obzirom na svoj razvoj nalaze između limfocita i monocita. Glavna im je fiziološka funkcija djelovanje protiv virusom zaraženih i tumorskih stanica otpuštanjem litičkih granula koje sadrže granzim i perforin (73,75). NK stanice migriraju u dojku iz limfnih žila i sistemske cirkulacije (132), i ne samo da igraju zaštitnu ulogu u GIT dojenčadi, već štite i mliječnu žlijezdu od infekcija (25).

1.10. Prirodna i stečena imunost

1.10.1. Prirodna imunost

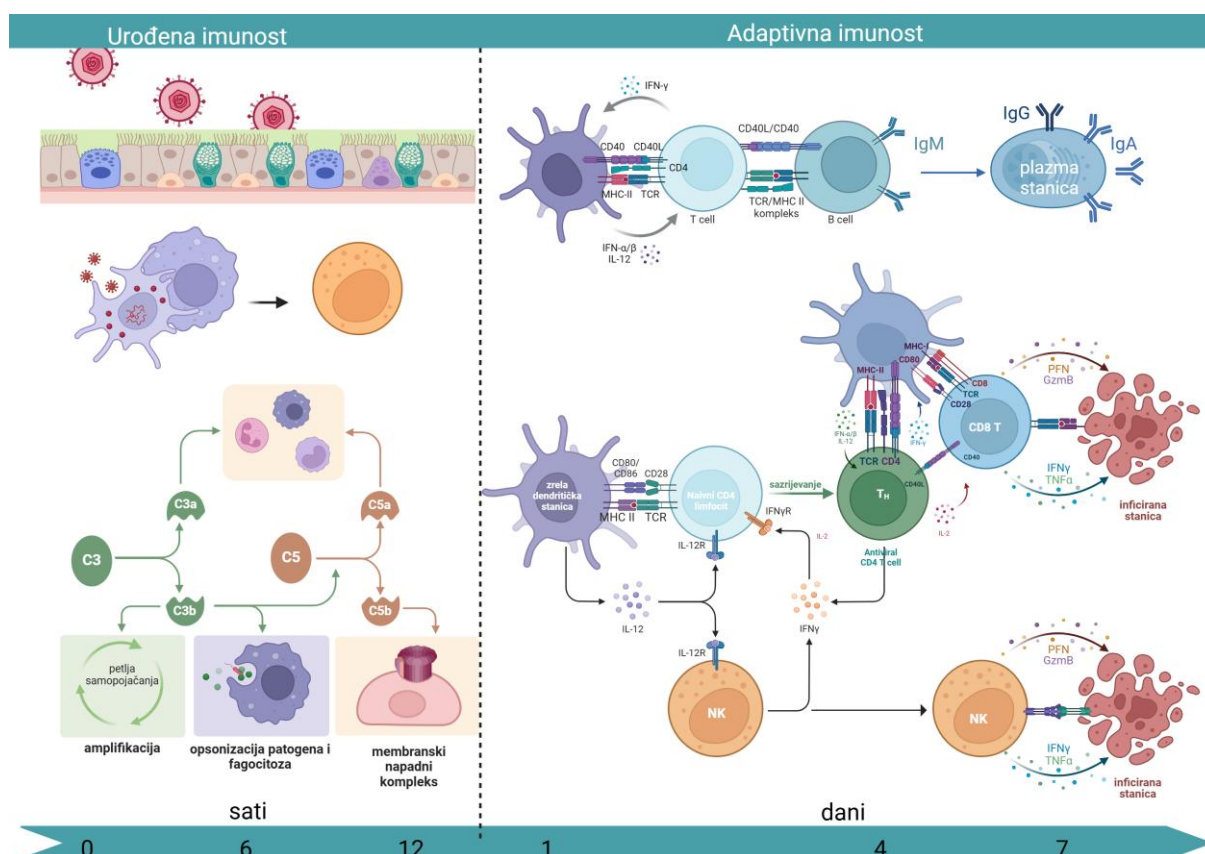
Urođena ili prirodna imunost pruža najraniju obranu od mikroorganizama. Ona postoji i prije infekcije i spremna je pružiti brzi odgovor, a sastoji se od staničnih i biokemijskih obrambenih mehanizama. Glavni mehanizmi urođene imunosti su fizičke i kemijske prepreke kao što su epitel i antimikrobne tvari koje se stvaraju na površini epitela, fagocitne stanice, dendričke stanice, prirodnoubilačke stanice i druge urođene limfoidne stanice, bjelančevine krvi, sustav komplementa i drugi posrednici upale (126,133). Slika br.1.3. prikazuje urođenu i adaptivnu (stečenu) imunost. Mehanizmi urođene imunosti osiguravaju učinkovitu ranu obranu od infekcije. Do aktivacije prirodne imunosti dolazi uslijed prepoznavanja oštećenih stanica i proizvoda mikroorganizama, a kod ponovljene izloženosti nastaje istovjetna reakcija (122). Prirodna imunost ima ograničeni broj antigena koje prepoznaje (oko 10^3) te se pri tome radi najčešće o konzerviranim strukturnim antigenima mikroorganizama koji nisu podložni brzim evolucijskim promjenama (npr. lipopolisaharid bakterija, jednolančana RNA virusa). Antigeni koje prepoznaju stanice prirodne imunosti nazivamo molekularnim obrascima, a receptori putem kojih ih stanice imunološkog sustava prepoznaju receptorima molekularnih obrazaca. Dvije su glavne skupine antigena molekularni uzorak povezan s patogenima (PAMP od engl. *patogen-associated molecular patterns*) i molekularni uzorak povezan s oštećenjem tkiva (DAMP od engl. *damage-associated molecular patterns*) (134,135).

1.10.2. Stečena imunost

Stečena ili adaptivna imunost razvija se kao odgovor na zarazu i prilagođava se uzročniku zaraze. Kod ponovljene izloženosti reagira povećavajući obrambenu sposobnost. Svojstva specifične imunosti su specifičnost i memorija. Pod pojmom specifičnost definira se sposobnost razlikovanja različitih tvari, a pod pojmom memorija definira se sposobnost da na ponovljenu reakciju odgovori snažnije. Sastavnica urođene imunosti su stanice koje nazivamo limfociti i njihovi izlučeni proizvodi tj. protutijela. Citokini su velika skupina izlučenih proteina koji imaju različitu građu i funkciju i reguliraju brojne aktivnosti urođene i stečene imunosti. Nazivlje citokina nije dosljedna pa se tako neki od njih nazivaju interleukini s rednim brojem, neki se nazivaju prema biološkom djelovanju koje im je prvo prepisano kao

što je čimbenik tumorske nekroze (TNF *od eng.-tumor necrosis factor*) ili interferon. Citokini imaju brojne funkcije kao što su: rast i diferencijacija svih imunosnih stanica, aktivacija izvršnih funkcija limfocita i fagocita i usmjereno kretanje imunosnih stanica iz krvi u tkiva i kroz njih.

Razlikujemo dvije vrste stečene imunosti koje su posredovane različitim sastavnicama imunosnog sustava, a to su: humoralna imunost i stanična imunost tj. imunost posredovana stanicama. Obje vrste djeluju na uklanjanje različitih vrsta mikroorganizama. Humoralna imunost posredovana je protutijelima koje stvaraju B stanice koje zovemo B limfociti. Protutijela prepoznaju mikroorganizme te neutraliziraju infektivnost i uklanjaju različitim mehanizmima. Humoralna imunost čini glavni obrambeni mehanizam protiv izvanstaničnih mikroorganizama i njihovih toksina. Protutijela su specijalizirana te mogu aktivirati različite mehanizme za borbu protiv mikroorganizama, primjerice fagocitozu. Stanična imunost je posredovana T stanicama koje zovemo T limfociti. T limfociti pružaju obranu od unutarstaničnih mikroorganizama kao što su virusi i neke bakterije koje žive i razmnožavaju se unutar fagocita i drugih stanica. Ti mikroorganizmi su nedostupni cirkulirajućim protutijelima (126). Svojstva urođene i adaptivne imunosti prikazan je u tablici broj 1.2.



Slika 1.3. Urođena i adaptivna imunost

Izvor slike: autorski rad, kreirano pomoću BioRender programskog alata

Tablica 1.2. Svojstva urođene i adaptivne imunosti

Svojstva urođene i adaptivne imunosti		
Urođena		Adaptivna
Svojstva		
Specifičnost	Za molekule koje dijele skupine srodnih mikroorganizama i molekule koje proizvode oštećene stanice domaćina	Za antigene mikroorganizama i ne-mikroorganizama
Raznolikost	Ograničena; kodirana u zametnoj lozi	Vrlo velika; receptori se stvaraju somatskom rekombinacijom genskih segmenata
Memorija	Ne	Da
Nereaktivnost na vlastito	Da	Da
Sastavnice		
Stanične i kemijske zapreke	Koža, epitel sluznica; antimikrobne molekule	Limfociti u epitelu, protutijela izlučena na egitelnim površinama
Bjelančevine krvi	Komplement, druge	protutijela
Stanice	Fagociti (makrofagi, neutrofili), prirodno ubilačke stanice, urođene limfoidne stanice	limfociti

1.10.3. $\gamma\delta$ T limfociti

$\gamma\delta$ T stanice relativno su rijetka podskupina limfocita u ljudskoj perifernoj krvi. Oni imaju važnu ulogu na međusklopu između urođenog i adaptivnog imunološkog sustava (136). $\gamma\delta$ T stanice mogu prepoznati antigen putem somatski preuređenog T-staničnog receptora (TCR) i nekoliko NK-staničnih receptora. Proizvode citokine i djeluju kao most između urođene i adaptivne imunosti, tako što brzo reagiraju na zaražene ili transformirane stanice na način neovisan o molekulama glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC) (123,124). Većina $\gamma\delta$ T stanica su $CD4^-$ ili $CD8^-$ T stanice.

T stanice su podijeljene u dvije glavne populacije koje se razlikuju po svojoj površinskoj ekspresiji $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ T staničnih receptora (TCR). I $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ T stanice nastaju iz zajedničkih multipotentnih dvostruko negativnih (DN) prekursora u timusu, koji se dalje mogu razdvojiti u četiri DN podskupa na temelju ekspresije CD44 i CD25 (137,138). Većina T-stanica, koje se često nazivaju konvencionalnim T-stanicama, eksprimiraju T-stanični receptor (TCR) koji se sastoji od α i β -lanca, dok otprilike 5% perifernih T-stanica eksprimira TCR izgrađen od γ i δ -lanca – taj se podskup obično naziva $\gamma\delta$ T limfociti (139,140). $\gamma\delta$ T stanice su među prvim T stanicama koje su se razvile u timusu. I kod ljudi i kod miševa, $\gamma\delta$ T stanice čine manji dio (1-5%) cirkulirajućeg odjeljka T stanica koji se nalazi u krvi i sekundarnim limfoidnim organima. Većinom su raspoređene u potkožnom tkivu, sluznici crijevnog trakta, respiratornog trakta i urogenitalnog trakta (141). $\gamma\delta$ T stanice čine 1-10% $CD3^+$ T limfocita periferne krvi zdravih odraslih osoba (118). Specifični podskupine $\gamma\delta$ T stanica prisutne su u mnogo većem broju (10-100%) u epitelnim tkivima kao što su epidermis kože, gastrointestinalni trakt i reproduktivni put gdje izražavaju tkivno specifične T stanične receptore ograničene raznolikosti (142,143). Kod ljudi je primijećeno više $\gamma\delta$ T subpopulacija čiji je biološki značaj nejasan. Prema repertoaru δ lanaca, $\gamma\delta$ stanice najčešće se dijele u tri razreda ($\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$), od kojih $\delta 2^+$ stanice dominantno prebivaju u perifernoj krvi i najčešće izražavaju $\gamma 9$ lanac, dok $\delta 1/\delta 3$ linije uglavnom nalazimo u tkivima i sluznicama, a izražavaju raznolike γ lance ($\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\gamma 5$, $\gamma 8$, $\gamma 9$) (139). $\gamma\delta$ T stanice sposobne su brzo odgovoriti na niz prijetnji, uključujući neke virusne i bakterijske infekcije (144). Smatra se da su uključeni u ljudske autoimune bolesti poput multiple skleroze, kod koje mogu biti važan izvor ranog interleukina (IL)-17 koji pokreće daljnju proizvodnju IL-17 od strane Th17 stanica (145,146). Istraživanja su također pokazala moguću ulogu $\gamma\delta$ T stanica u zdravlju majki, pomoći u borbi

protiv infekcija, alergija i osobito u nadzoru raka, uključujući borbu protiv agresivnih oblika raka dojke. Ove stanice mogu učinkovitije prepoznati i reagirati na stanice raka (147,148).

Ljudske $\gamma\delta$ T stanice mogu se podijeliti u tri glavne populacije na temelju ekspresije δ lanca. $\gamma\delta$ T stanice koje ekspimiraju V δ 1 lance nalaze se u intraepitelnom sloju mukoznih površina, te sudjeluju u održavanje integriteta epitelnog tkiva kada su suočene s infekcijom ili oštećenjem. Mogu se pojaviti i u perifernoj krvi (138). Oni proizvode različite citokine kao što su TNF- α i IFN- γ , te citotoksičnošću liziraju zaražene ili transformirane ciljne stanice (136,141).

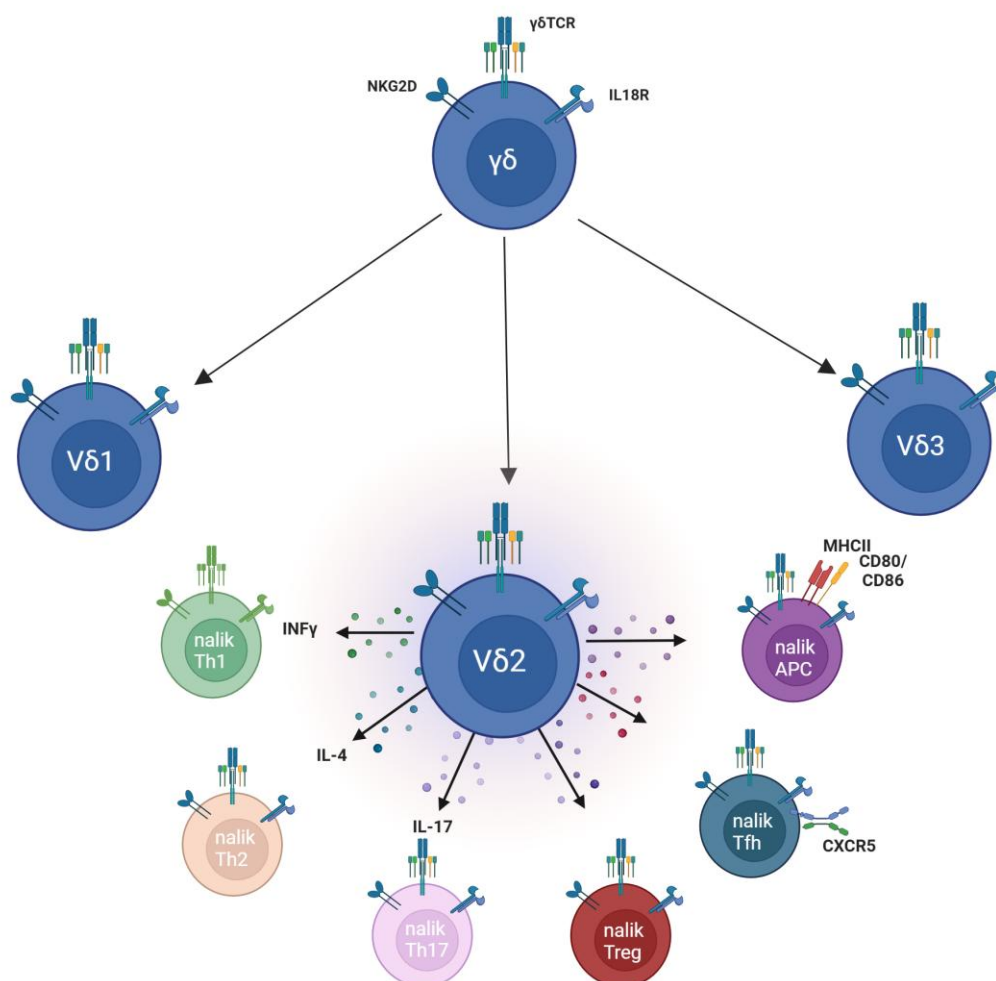
Druga populacija $\gamma\delta$ T stanica eksprimira produkte lanca V δ 2 i predstavlja većinu cirkulirajućih $\gamma\delta$ T limfocita u zdravih odraslih osoba, te čini do 50%-90% periferne populacije $\gamma\delta$ T-stanica. Lanac V δ 2 spaja se gotovo isključivo s V γ 9 (koji se također naziva V γ 2). Jedna važna karakteristika V δ 2 T stanica je da mogu služiti kao profesionalne stanice koje prezentiraju antigen (APC) (149). V δ 2 T stanice, koje ispoljavaju citotoksičnost u tumorskoj imunoregulaciji i virusnoj infekciji, većinom su raspoređene u perifernoj krvi.

Treća populacija su V δ 3 T stanice, koje čine oko 0,2% cirkulirajućih T stanica uključujući CD4⁺, CD8⁺ i CD4⁻CD8⁻ podskupove. Imaju ekspresiju CD56, CD161, HLA-DR i NKG2D, ali bez NKG2A i NKG2C (138,150). V δ 3 T stanice u krvi se pronalaze u malom broju, ali najviše ih ima u jetri i kod pacijenata s leukemijama i nekim kroničnim virusnim infekcijama (150). V δ 3 T stanice uglavnom su raspoređene u tkivu jetre i rijetko u perifernoj krvi, što može izravno ubiti ciljne stanice i lučiti citokine (141).

$\gamma\delta$ T-stanice mogu se funkcionalno podijeliti u više podskupina, npr. Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Tfh, regulatorne T-stanice (Treg) i $\gamma\delta$ -stanice koje predstavljaju antigen (APC) T-stanice (148).

$\gamma\delta$ T stanice su neophodne za održavanje homeostaze tako što odabiru specifične organizme u mikrobioti i obavljaju imunoregulacijske funkcije, $\gamma\delta$ T stanice izravno olakšavaju trudnoću proizvodnjom faktora rasta (151). U istraživanju Caccamo et. all. pokazali su utjecaj spola i dobi na razine V δ 2 u krvi, pri čemu žene imaju niže razine u usporedbi s muškarcima iste dobi (152). Studije govore da razine V δ 2 T stanica mogu biti kontrolirane višestrukim mehanizmima, što rezultira razlikom u populaciji $\gamma\delta$ T stanica periferne krvi među ljudima (153–155). Budući da $\gamma\delta$ T stanice brzo prepoznaju zaražene i transformirane stanice, prepoznate su kao prva linija obrane od infekcija i malignih tumora (156).

Glavne populacije ljudskih $\gamma\delta$ T stanica prikazani su na slici br.1.4



Slika 1.4. Glavne populacije ljudskih $\gamma\delta$ T stanica

Izvor slike: autorski rad, kreirano pomoću BioRender programskog alata

$\gamma\delta$ T limfociti u mnogo većem dijelu se nalaze u kolostrumu nego u krvi. Fenotipski profil $\gamma\delta$ T stanica u mlijeku sličan je onome u stanicama intraepitelnog limfnog sustava crijeva što govori o tome da ove stanice možda potječu iz pridruženog limfnog sustava crijeva i preusmjerenja T limfocita iz majčinog crijeva u mliječnu žlijezdu i mlijeko (157). Istraživanje Lindstranda i sur. koji su koristili tri monoklonska antitijela na varijabilne dijelove ljudskog TCR (V γ 2, V δ 2 i V δ 1) kako bi odredili relativne frekvencije i fenotipske karakteristike $\gamma\delta$ T stanica u perifernoj krvi i majčinom mlijeku. Testirali su mlijeko 12 žena u

vremenu 1 do 3 dana nakon poroda. Istraživanjem su dokazali da $V\gamma 2$ i $V\delta 1$ stanice su češće prisutne u kolostrumu nego u krvi, dok se omjer $V\delta 2$ stanica ne razlikuje. I njihovo istraživanje je dovelo do zaključka da raspodjela podskupina $\gamma\delta$ T stanica u ljudskom kolostrumu je rezultat mehanizma preusmjerenja $\gamma\delta$ T limfocita iz crijevne sluznice u mliječnu žlijezdu (157).

1.11. Razvoj imunološkog sustava dojenčeta

Novorođenče se rađa s nezrelim imunološkim sustavom i oslanja se na majčin imunitet. Majčina protutijela se prenose preko placente i dojenjem. U placenti se majčina imunost uglavnom prenosi kao imunoglobulin G (IgG), koji prelazi izravno u serum dojenčadi i ključan je u zaštiti od mnogih infekcija u djetinjstvu (158).

1.11.1. Postnatalni razvoj imunološkog sustava

Tijekom prvog hranjenja kolostrumom novorođenče dobiva gotove molekule IgA. Kolostrum je količinski oskudan, no sadrži velike količine proteina (4-5 g/L) koji sadrže velike količine IgA. Proteini majčinog mlijeka pomažu u pružanju odgovarajuće prehrane dojenoj dojenčadi, dok istovremeno pomažu u obrani od infekcija i olakšavaju optimalan razvoj važnih fizioloških funkcija u novorođenčadi. Reprezentativni imunološki proteini uključuju α -laktalbumin, laktoferin, lizozim i sekretorni imunoglobulin A (sIgA), koji su svi proteini sirutke (27,113). 70% ukupnih imunoglobulina čini upravo IgA koji djeluje u obrani u sekretima dišnog i probavnog sustava procesom imunosnog isključenja tj. vezanja za strane antigene i na taj način sprečava njihovo štetno djelovanje na sluznicu epitela. U dojci IgA proizvode plazma stanice koje su podrijetlom iz B limfocita senzibiliziranih na antigene u majčinom probavnom, dišnom sustavu te na koži. Koncentracija IgA je 10-12 puta viša u odnosu na koncentraciju u serumu majke. Kolostrum i zrelo mlijeko sadrže i komplement, antibakterijske proteine - laktoferin, lizozim, protein koji veže vitamin B12 i oligosaharide te svi oni na sebi svojstven način pomažu u obrani organizma u doticaju s antigenom. HM sadržava i prebiotike koji potiču rast bifidusne flore.

1.11.2. Uloga majčinih staničnih i humoralnih čimbenika u imunološkoj zaštiti novorođenčeta

Imunosni sustav ima funkciju obrane organizma od stranih stanica kao što su mikroorganizmi, paraziti, tuđa tkiva i stanice. Ljudski organizam ne može preživjeti bez imunosti, jer strada od infekcija. Pod pojmom imunost podrazumijevamo različite mehanizme kojima organizam prepoznaje i reagira na strane tvari da bi održao vlastitu cjelovitost (1). Imunost može biti urođena (nespecifična) i stečena (specifična), a svaka od njih ima svoj humoralni i stanični dio. Prirođenu humoralnu imunost čine komplement i reaktanti akutne faze, a prirođenu staničnu makrofagno fagocitni sustav i NK-stanice. Stečenu humoralnu imunost čine imunoglobulini koje stvaraju B limfociti, a za stečenu staničnu imunost bitni su T limfociti.

Već od 4. mjeseca prenatalnog razvoja hematopoeza se premješta iz jetre i slezene u koštanu srž i od tada je već moguće dokazati prve elemente specifične stanične i humoralne imunosti u fetusa. Proizvodnja komplemeta počinje od 8. tjedna trudnoće u jetri i stanicama retikuloendotelnog sustava i oko rođenja doseže 50-60% razine kao u odraslog čovjeka (1). Reaktanti akutne faze se također sintetiziraju u jetri i stanicama retikuloendotelnog sustava, ali pod utjecajem $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6 iz makrofaga u slučaju akutne infekcije bakterija ili gljivica. Polimorfonuklearni granulociti novorođenčeta imaju slabiju kemotaksiju, prijanjanje i unutarstanično ubijanje. Iako se makrofagi razvijaju već od 10. tjedna trudnoće prilikom rođenja zaostaju u proizvodnji citokina. Upravo zbog toga novorođenčetu za primarne imunostne reakcije treba 3-4 tjedna. NK stanice još prenatalno pokazuju dobru citotoksičnu i antivirusnu aktivnost. Stečena stanična imunost putem limfocita T razvija se već od 12. tjedna trudnoće reagirajući na fitohemaglutinin i alogenične stanice. U odnosu na odrasli organizam ima niski udio memorijskih T-stanica (<5%) u trenutku rođenja, no prilikom rođenja dolazi do naglog rasta tih stanica prilikom doticaja sa raznim antigenima. B-limfociti (stečena humoralna imunost) već od 12. tjedna trudnoće mogu stvarati IgM i IgG, a malo kasnije počinju stvarati i IgA. Povećana osjetljivost novorođenčeta na infekcije potječe od nezrelosti imunološkog sustava. Dojenje predstavlja važnu imunološku potporu koju majka može dati svom djetetu tijekom prvih nekoliko mjeseci života (158). Imunološki sustav u majčinom mlijeku uključuje sekretorni imunoglobulin A (sIgA), imunoglobulin G, slobodne masne kiseline, monogliceride, proteine kao što su laktoferin, laktalbumin, glikani, neapsorbirane oligosaharide, egzosome, imunomodulatore kao što su citokini, nukleinske kiseline, antioksidansi i imunološke stanice kao što su makrofagi, neutrofili i limfociti. Svi ovi imunološki sastojci mlijeka međusobno djeluju zajedno i s crijevima novorođenčeta izravno ili neizravno kako bi povećali imunitet protiv infekcija, a vjerojatno također doprinose sazrijevanju i učinkovitosti imunološkog sustava novorođenčeta.

1.11.3. Imunost sluznica

Imunološki sustav sluznice brzo se stimulira prilikom rođenja bakterijskom kolonizacijom sluznice i vanjskih površina tijela. Razvoj učinkovitog mukoznog imuniteta bitan je za zaštitu od infekcije i izloženosti alergenima u postnatalnom razdoblju. Ovo razdoblje karakteriziraju dvije važne komponente imunološkog razvoja novorođenčeta: zatvaranje epitelnih membrana sluznice i pojava sekretornih protutijela.

Neposredno postnatalno razdoblje karakterizira intestinalna propusnost za netaknute makromolekule. Gutanje kolostruma potiče sazrijevanje membrane u gastrointestinalnom traktu putem regulatornih čimbenika i rezultira zatvaranjem unutar 48 sati od rođenja (159). Brzo zatvaranje membrana važan je proces u ograničavanju sustavne izloženosti antigenima, koji, ako se postupa neprikladno, može dovesti do teške infekcije, atopije ili naknadne tolerancije. Čimbenici sazrijevanja membrane u kolostrumu mogu biti značajan čimbenik u smanjenoj incidenciji infekcija i atopije kod dojene djece.

Gestacijska dob novorođenčeta pri rođenju određuje razinu imunološke kompetentnosti i stupanj pasivno stečenih majčinih protutijela koja pružaju učinkovitu obranu od infekcija i drugih antigenih podražaja. U kombinaciji s urođenom imunošću, imunološki sustav sluznice pruža prvu liniju obrane protiv infekcija na vanjskim površinama. Sastoji se od struktura povezanih limfoidnim tkivima nazalnog, gastrointestinalnog, urogenitalnog, respiratornog trakta te suznih žlijezda, žlijezda slinovnica i mliječnih žlijezda i sinoviju zglobova. Limfoidna tkiva povezana sa sluznicom omogućuju plazma stanicama koje su aktivirane na jednom mjestu da se premjeste na udaljena mjesta i tako osiguravaju opsežnu imunološku zaštitu na površinama sluznica. Glavna vrsta antitijela u mukoznim sekretima je IgA, a mali su udjeli IgM, IgG, IgD i rijetko IgE.

Obično se imunološki sustav sluznica aktivira od rođenja, no on je sposoban postaviti imunosni odgovor i kod fetusa. Učinkovit imunološki odgovor sluznice mogu uspostaviti nedonoščad starija od 28. tjedna gestacije (159).

Urođeni obrambeni mehanizmi pružaju nespecifičnu zaštitu u fetalnom životu i prilikom rođenja. Amilaza, lizozim i laktoferin prisutni su u žlijezdama slinovnicama u istim razinama u fetalnom razdoblju i prilikom rođenja. Nakon rođenja padaju, te velike razine postižu

između 6. i 20. tjedna starosti. U dojene djece ovaj se deficit prilikom rođenja najvjerojatnije suzbija pasivnom zaštitom majčinih protutijela.

Terminsko novorođenče se obično rađa s nedostatkom IgA i potrebno je nekoliko tjedana dok limfno tkivo koje je povezano s crijevima odgovori na antigen. Vrhunac sazrijevanja B limfocita na površinama sluznica je od rođenja do 12 tjedana starosti. U crijevima broj stanica koje sadrže IgM prevladava do 1 mjeseca starosti, nakon toga, stanice koje sadrže IgA prevladavaju i nastavljaju rasti do 2 godine starosti (160). Stanice koje sadrže imunoglobulin nisu prisutne u stjenkama bronha zdrave novorođenčadi pri rođenju. Stanice koje sadrže IgA pojavljuju se oko bronhijalnih žlijezda 10 dana nakon rođenja, a stanice koje sadrže IgM u manjem broju oko 1 mjeseca starosti. Stanice koje sadrže IgG rijetke su u normalnim zdravim uvjetima (161). U parotidnoj žlijezdi slinovnici IgA i IgD povećavaju se u broju od oko 4 tjedna starosti, dosežu vrhunac u dobi od oko 12 tjedana, a zatim se nalaze na nižem broju nakon 24 tjedna starosti (162).

2. Hipoteza

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

3. Ciljevi istraživanja

- i. 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).
- ii. Odrediti citokinski sastav mlijeka ($\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-4 , IL-6 , IL-17A , $\text{TNF}\alpha$) tijekom akutne infekcije dojenčeta te nakon potpune rekonvalescencije (nakon 4-6 tjedana).
- iii. Odrediti imunoglobulinski profil mlijeka (IgG , IgA , IgE , IgM) tijekom akutne infekcije dojenčeta te nakon potpune rekonvalescencije (nakon 4-6 tjedana).

4. Ispitanici i metode

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (broj: R2-7990 /2021.), Etičkog povjerenstva Doma zdravlja Osječko-baranjske županije (DZOBŽ) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/21-08/07, broj: 2158-61-07-21-156). Ovo prospektivno eksperimentalno kontrolirano istraživanje u cijelosti je provedeno u Laboratoriju za analizu DNA Medicinskog fakulteta Osijek i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek, a sve su ispitanice nakon pročitane obavijesti o istraživanju potpisali dobrovoljni informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju (Prilog 1. i Prilog 2.)

4.2. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 43 ispitanice, koje su bile podijeljene u dvije skupine. Prvu skupinu (28 majki) su činile majke koje su dojile dojenčce s kliničkim znakovima akutne infekcije (akutno febrilno stanje, eventualne druge (ne)specifične znakove infekcije dojenčeta – razdražljivost, proljev, bljućkanje, plač, ubrzano disanje, dispneja, dispnea, klonulost, slabo napredovanje na težini, osip na koži, marmorizirana koža, hladne okrajine, slaba cirkulacija, perioralna cijanoza, koja može biti eventualno potvrđena rutinskom laboratorijskom analizom (promjene u DKS, CRP ili SE) i u određenim slučajevima mikrobiološkom obradom (npr. bris ždrijela, urinokultura, analiza stolice). Drugu skupinu su činile majke koje su dojile zdravu dojenčad, bez kliničkih znakova infekcije. Veličina učinka (Cohenov d , Δ/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 (Δ) 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.)

Iz istraživanja su isključene:

1. Ispitanice koji nisu bile punoljetne,
2. Ispitanice koje nisu dojile dojenče,
3. Ispitanice koje pokazuju kliničke i/ili laboratorijske znakove akutne infekcije.

Ispitanice su regrutirane u hitnoj pedijatrijskoj ambulanti KBCO te pedijatrijskim ordinacijama u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (privatnim pedijatrijskim ordinacijama i pedijatrijskim ordinacijama DZOBŽ), te prilikom posjeta patronažnih sestara.

Inicijalno su zabilježeni osnovni identifikacijski i demografski podaci (ime, prezime, dob, socioekonomski podatci) te anamnestički podatci vezani uz trudnoću te rani razvoj djeteta s naglaskom na prethodne infekcije majke i dojenčeta u tom periodu (Prilog 3). Kod drugog uzorkovanja mlijeka majke su ispunile upitnik o osobnom zdravstvenom stanju te zdravstvenom stanju djeteta (kako bi isključili bolest majke i djeteta) (Prilog 4). U okviru rutinske obrade dojenčeta učinjena je analiza (kapilarne ili venske) krvi te potrebna mikrobiološka obrada, dok je majkama učinjena laboratorijska obrada u svrhu isključivanja infekcije. Majke su zamoljene da u svrhu istraživanja ustupe 50 – 100 ml majčinog mlijeka izdojenog tijekom drugog podoja u danu 3. – 5. dan od prvih znakova akutne infekcije dojenčeta, (7. dan) te nakon 4 – 6 tjedana u fazi kompletne konvalescencije.

4.3. Metode

Uzorci mlijeka su centrifugirani (600 x g, 15 min, 4°C), kako bi razdvojili staničnu, lipidnu i vodenu (tzv. laktoserum) fazu mlijeka. Stanična frakcija je odmah procesuirana za imunofenotipizaciju leukocita (ispiranje u 5 mL 1 x PBS pufera (*od eng. Phosphate Buffered Saline Solution*), centrifugiranje 400 x g, 5 min, 25°C, resuspendiranje peleta). Mononuklearne stanice izolirane su centrifugiranjem stanične frakcije mlijeka na gradijentu Lymphoprep. Broj izoliranih stanica utvrđen je pomoću automatskog brojača stanica Luna II te je za obilježavanja stanica s monoklonalnim protutijelima korišteno

najmanje 1×10^6 živih stanica, dok su se preostale dvije frakcije mlijeka u manjim alikvotima pohranile na -80°C do daljne analize.

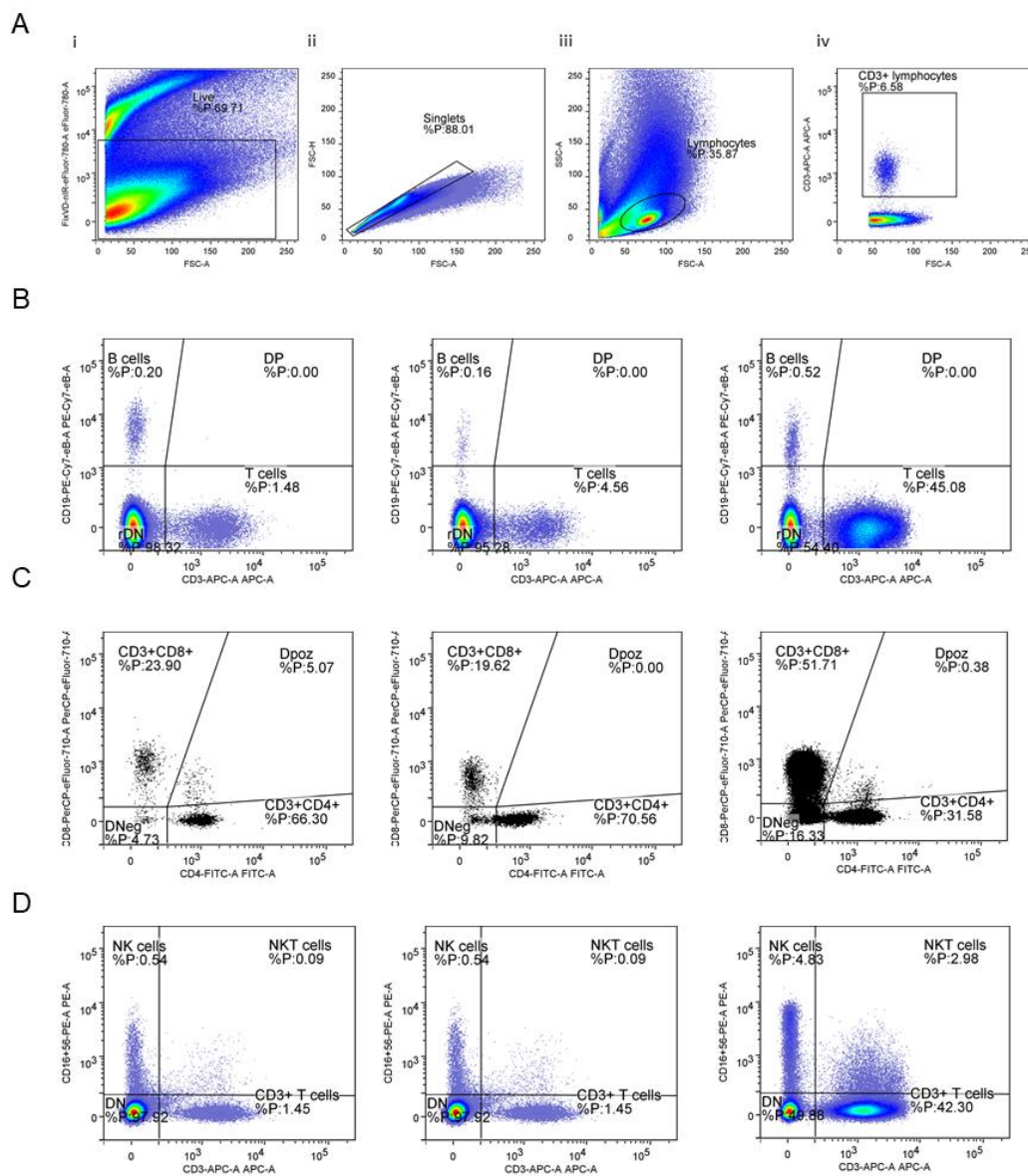
4.3.1. Imunofenotipizacija leukocita majčinog mlijeka metodom protočne citometrije

Zastupljenost ukupnih T limfocita, CD4 pomoćničkih limfocita, CD8 citotoksičnih limfocita, NK stanica, $\delta 1$ i $\delta 2$ subpopulacija $\gamma\delta$ T limfocita te B stanica u ukupnim izoliranim leukocitima majčinog mlijeka određena je metodom protočne citometrije. Za pripremu uzoraka i bojenje površnih staničnih antigena za protočnu citometriju korišteni su standardni protokoli dostupni na www.thermofisher.com. Ukratko, prije staničnog bojenja, mrtve stanice su nepovratno obilježene fiksabilnom bojom za vijabilnost LIVE/DEAD Fixable near-IR Stain (Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača, a nespecifično bojenje posredovano vezanjem protutijela za Fc receptore (FcR) blokirano dodavanjem 5 uL Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody reagensa (eBioscience/Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon 8 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorcima je dodana smjesa specifičnih fluorescentno obilježenih protutijela, kako slijedi: CD3εAPC (klon UCHT1, eBioscience), TCRγδ PerCP eFlour710 (klon B1-1, eBioscience), TCRVδ1 PE/Cy7 (clone TS8.2, eBiosciences) i TCRVδ2 PE (clone REA771, Miltenyi Biotec), CD4 FITC (clone RPA-T4, eBiosciences), CD8 PerCP eFlour710 (clone OKT8, eBiosciences), CD16 PE (clone CB16, eBiosciences), CD56 PE (clone CMSSB, eBiosciences), CD199 PE/Cy7 (clone HIB19, eBiosciences). U svim koracima korišten je fosfatni pufer (PBS) s dodatkom 0,5-1% goveđeg serumskog albumina (BSA) i 0.1% natrijevog azida (NaN_3) prilagođene pH vrijednosti ($\text{pH} \sim 7,4$).

Uz pažljivu pripremu uzorka i optimizaciju protokola bojenja, tijekom uhodavanja pokusa pripremljene su jednoboje, fluorescencija minus jedan (FMO), nebojene i negativne kontrole kako bi pouzdano mogli razlikovati pozitivne stanice od pozadinskog/negativnog i nespecifičnog bojenja.

Kompenzacijska matrica izračunata je pomoću komercijalno dostupnih kompenzacijskih kuglica BDTM CompBeads mišji Igκ/negativne kontrol (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) i jednobožnih kontrola. Mjerenja uzoraka provedena su na BD FACSLytic™ 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 učinjena je pomoću FlowLogic programa (v 11,0; Inivai Technologies; Mentone; Australija).

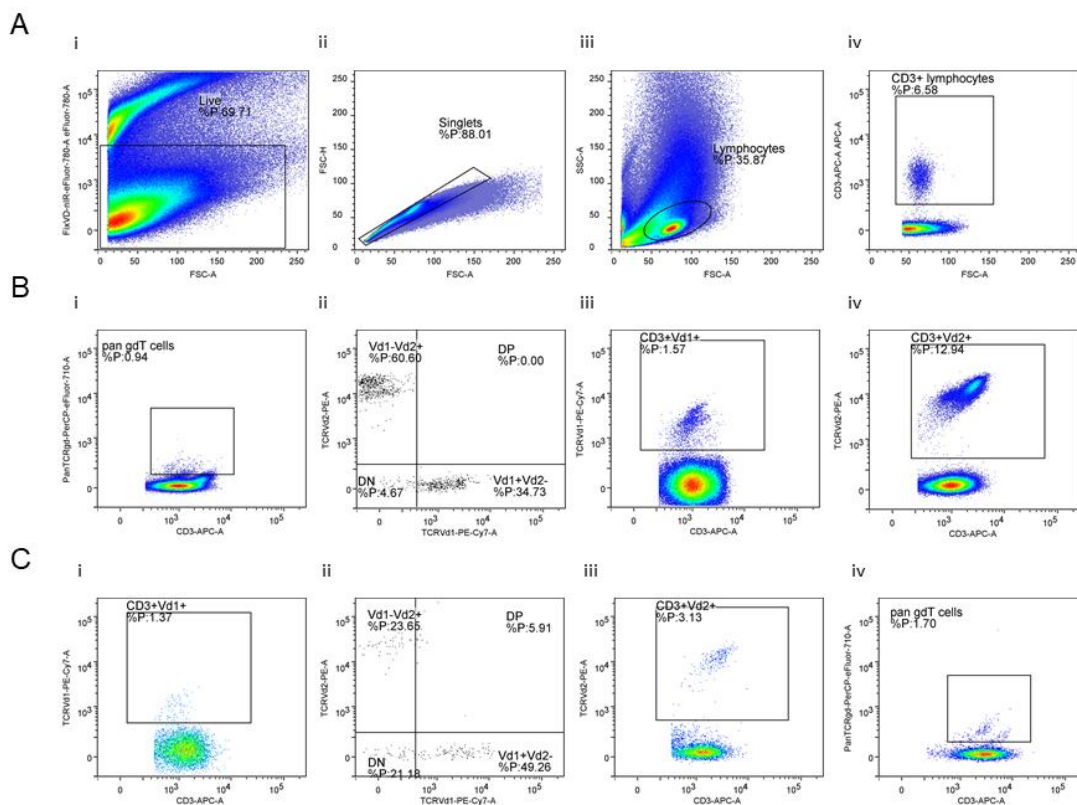
Shematski protokol istraživanja prikazan je na slici br.4.1.



Slika 4.1. Analiza staničnog sastava mlijeka pomoću protočne citometrije

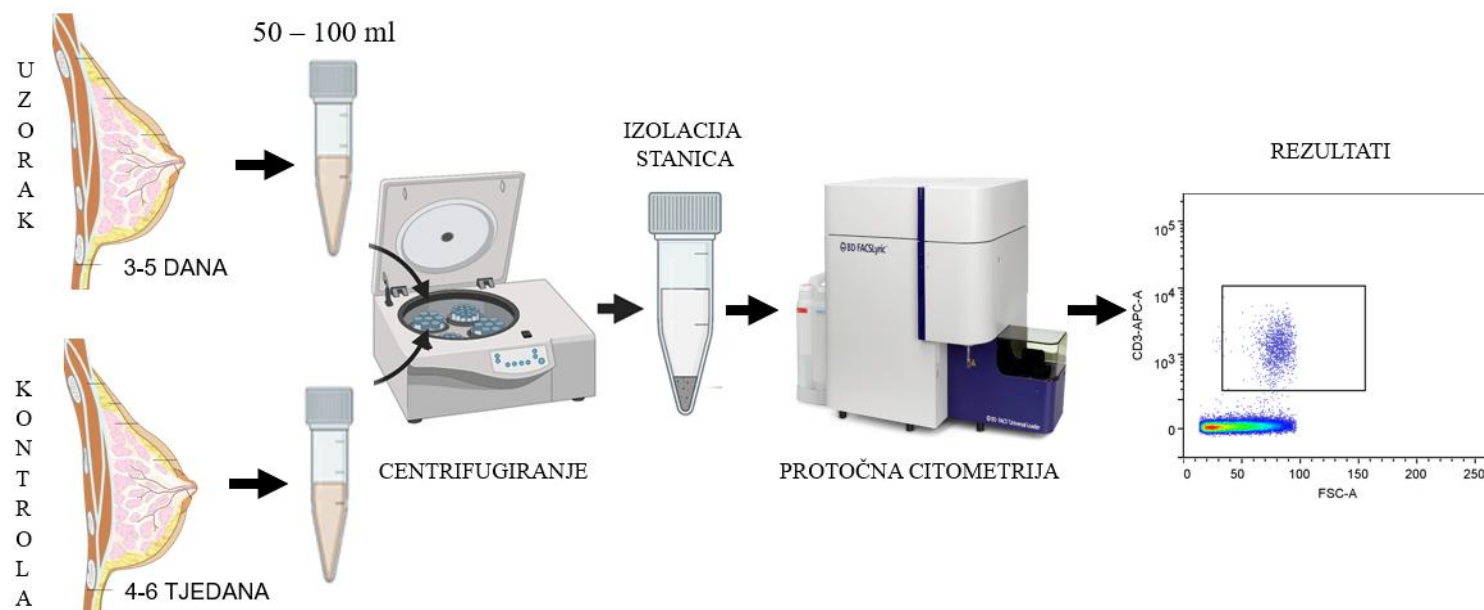
Protočnom citometrijom je određen fenotip i zastupljenost pojedinih stanica unutar populacije limfocita. Prvotno su izdvojene žive stanice (FVD negativna populacija) (Ai), potom jednostruke stanice (tzv. singlets) na temelju površine i visine signala koji potječe od pravocrtnog raspršenja svjetlosti (forward scatter area (FSC-A) i forward scatter height (FSC-H)) (Aii). U sljedećem koraku definirana je populacija limfocita na temelju

pravocrtnog i postraničnog raspršenja svjetlosti (forward scatter area (FSC-A) i side scatter area (SSC-A)) koje daju podatke o veličini odnosno granuliranosti stanica (Aiii). Na temelju prisutnosti glikoproteina CD3 definirana je populacija T-limfocita (Aiv). Nadalje su na temelju izražaja CD19 i CD3 limfociti iz Aiii su analizirani za zastupljenost B limfocita i T limfocita (B). U panelu C pomoću glikoproteina CD4 i CD8 izdvojeni limfociti su analizirani za udjele pomoćničkih ($CD3^+CD4^+$) i citotoksičnih ($CD3^+CD8^+$) T limfocita, a u panelu D pomoću CD56/CD16 markera su dodatno određeni udjeli NK stanica ($CD3^+CD56/16^+$) i NK T limfocita ($CD3^+CD56/16^+$). FVD - fiksabilna boja za vijabilnost (od engl. fixable viability dye); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (engl. fluorescein isothiocyanate); PE-Cy7 - od engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7); PerCP - od engl. peridinin chlorophyll protein.



Slika 4.2. Analiza udjela $\gamma\delta$ T limfocita u majčinom mlijeku pomoću protočne citometrije

Protočnom citometrijom je određen fenotip i zastupljenost pojedinih stanica unutar populacije limfocita. Prvotno su izdvojene žive stanice (FVD negativna populacija) (Ai), potom jednostruke stanice (tzv. singlets) na temelju površine i visine signala koji potječe od pravocrtnog raspršenja svjetlosti (forward scatter area (FSC-A) i forward scatter height (FSC-H)) (Aii). U sljedećem koraku definirana je populacija limfocita na temelju pravocrtnog i postraničnog raspršenja svjetlosti (forward scatter area (FSC-A) i side scatter area (SSC-A)) koje daju podatke o veličini odnosno granuliranosti stanica (Aiii). Na temelju prisutnosti glikoproteina CD3 definirana je populacija T-limfocita (Aiv). Nadalje su na temelju izražaja pan-gd TCR markera, V δ 1 TCR lanca i V δ 2 TCR lanca određene frekvencije ukupnih (Bi i Ci), odnosno odgovarajućig subpopulacija delta 1 (Biii i Ciii) i delta 2 (Biv i Civ) $\gamma\delta$ T-limfocita.



Slika 4.3. Shematski prikaz protokola istraživanja za stanice mlijeka

Izvor slike: autorski rad

4.3.2. Utvrđivanje koncentracije imunoglobulina i citokina u majčinom mlijeku

Analiza koncentracije imunoglobulina (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE i IgM) i citokina (IFN- γ , IL-1 β , IL-17A (CTLA-8), IL-4, IL-6 i TNF- α) u vodnoj fazi majčinog mlijeka izvodila se primjenom posebno dizajniranih panela ProcartaPlex™ Human Antibody Isotyping Panel 7-Plex i Human HS ProcartaPlex™ Mix&Match 6-plex (ThermoFisher Scientific, Austria).

Priprema uzoraka za analizu uključivala je centrifugiranje prethodno otopljenih uzoraka tijekom 10 minuta pri 10 000 g na 4 °C nakon čega je supernatant odvojen i ponovno centrifugiran na sobnoj temperaturi i jednakom broju okretaja. Dobiveni supernatant prenesen je u novu tubicu i razrijeđen s *Universal Assay Buffer* 1x (1x UAB). Za potrebe utvrđivanja koncentracije imunoglobina, supernatant je razrijeđen u omjeru 1:200, a citokina u omjeru 1:10.

Reagensi i standardi iz oba seta pripremljeni su neposredno prije početka rada sukladno uputama proizvođača. Osim uzoraka, u analizu su uključeni blank uzorci i sedam standarda serijskog razrjeđenja za Ig je bilo 3x, a za citokine 4x, na osnovu kojih je generirana standardna krivulja potrebna za određivanje koncentracije analita u vodenoj fazi majčinog mlijeka.

4.3.3. Utvrđivanje koncentracije Ig - IgG1, IgG2, gG3, IgG4, IgA, IgE i IgM

Postupak analize izvodio se na pločici s 96 jažica u koje su u prvom koraku dodane magnetne kuglice. Uklanjanje tekućine u kojoj su bile magnetne kuglice, i nakon koraka ispiranja, tijekom cijele analize izvodilo se postavljanjem ploče u magnetni stalak. Nakon prvog koraka ispiranja, u jažice s magnetnim kuglicama dodan je 1x UAB pufer te uzorci/standardi sukladno prethodno određenim pozicijama na pločici. Uzorci su potom inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata uz miješanje na 600 rpm i zaštićeni od svjetlosti. Nakon inkubacije na magnetnom stalku od 2 minute supernatant je odliven, a jažice su isprane s 1x UAB. Postupak ispiranja ponovljen je dva puta. Na isprane uzorke dodano je 25 μ L otopine smjese anti-Ig protutijela i slijedila je nova inkubacija od 30

minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje od 600 rpm. Uzorci su ponovno isprani i u svaku jažicu dodano je 50 μ L otopine SAPE te je slijedila nova inkubacija u istim uvjetima. Dodavanjem pufera za očitavanje (*Reading Buffer*) u uzorke i inkubacije od 5 minuta uz miješanje na 600 rpm uzorci su bili spremni za očitavanje. Očitavanje rezultata primjenom tehnologije xMAP (engl. *Multi-analyte profiling*) izvodilo se na uređaju Luminex® 200™ i računalnog programa xPonent® (Slika br. 4.2)

Obrada i analiza rezultata napravljena je u računalnom programu ProcartaPlex™ Analysis App (Thermo Fisher Scientific).



Slika 4.4. Uređaju Luminex® 200™ i računalnog programa xPonent®

Izvor slike: autorski rad.

4.3.4. Utvrđivanje koncentracije citokina IFN- γ , IL-1 β , IL-17A (CTLA-8), IL-4, IL-6 i TNF- α

Analiza utvrđivanja koncentracije citokina također je izvođena na pločici s 96 jažica. Nakon nanošenja i ispiranja magnetnih kuglica, u svaku jažicu dodano je 25 μ L 1x UAB pufera i 25 μ L uzoraka ili standarda. Uzorci su potom inkubirani na sobnoj temperaturi, tijekom 30 minuta uz miješanje na 500 rpm nakon čega su pohranjeni preko noći u hladnjak na +4 °C. Prije nastavka analize, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi

tijekom 30 minuta pri 500 rpm. Nakon toga, jažice su dva puta isprane s 1x UAB (postupak ispiranja s 1x UAB ponavljao se nakon svake inkubacije, a prije sljedećeg koraka u analizi i rađen je u dva ponavljanja) te je dodana mješavina *Detection Antibody Mixture* (1x). Uzorci su zaštićeni od svjetlosti i slijedila je nova inkubacija tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi i uz miješanje na 500 rpm. Nakon ispiranja, u uzorke je dodano 50 µL otopine SAPE nakon čega su uzorci inkubirani u istim uvjetima. Nakon toga je u uzorke dodan amplifikacijski reagens 1 (*Amplification Reagent 1*). U inkubiranu smjesu uzoraka i amplifikacijskog reagensa 1 dodan je *Amplification Reagent 2* nakon čega je slijedila nova inkubacija u istim uvjetima. U posljednjem koraku pripreme, u svaki uzorak dodano je 120 µL pufera za očitavanje (*Reading Buffer*) i nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi i miješanje, uzorci su bili spremni za očitavanje. Očitavanje rezultata izvodilo se na uređaju Luminex® 200™ i računalnog programa xPonent®.

Obrada i analiza rezultata napravljena je u računalnom programu ProcartaPlex™ Analysis App (Thermo Fisher Scientific).

4.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su omjerima, apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podaci opisani su medijanom s interkvartilnim rasponom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom, a homogenost varijanci Levenovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju neovisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim testom, a u parnim testovima za ponovljena mjerenja korišten je Wilcoxonov test. U analizi cenzuriranih varijabli s izrazitim ekscesom nula u podacima svi su rezultati dihotomizirani u Bernoullijevu varijablu. U analizi tablica kontingencije (2 x 2) primjenjen je Fisherov egzaktni test.

Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije R (*Hmisc*, *corrplot*, *corrr*, *magrittr*, *tidyverse*, *rstatix*, *igraph* i *ggraph* knjižnice). Sve su P vrijednosti dvostrane, uz $P < 0.05$, ako nije drugačije naznačeno.

Redukcija dimenzionalnosti za skup koreliranih varijabli provedena je primjenom analize glavnih komponenti (*principal component analysis*, PCA) u *factoextra* i *FactoMineR* knjižnici.

Za simultano multivarijatno modeliranje varijable odziva (glavni efekti prediktora) primijenjen je generalni linearni model (*lme4*, *sjPlot*, *performance*, *emmeans* paket) nakon prethodne logaritamske transformacije varijabli. Dijagnostika modela provedena je analizom inflacije varijance, inspekcijom kvantilnih krivulja, odnosno testovima normalnosti i homogenosti reziduala.

Analiza redundancije (RDA, *redundancy analysis*) postignuta je primjenom *rda* funkcije u *vegan* paketu. Po potrebi, varijable su log-transformirane, potom skalirane i centrirane. Značajnost je testirana upotrebom *anova.cca* funkcije s 10^4 - 10^5 permutacija, a udio objašnjene varijance *RsquareAdj* funkcijom.

Podaci su vizualizirani korištenjem *ggpubr*, *ggarchery*, *ggfortify*, *ggpubr*, *hrbrthemes*, *ggbeeswarm*, *ggsignif*, *ggforce*, *ggridges* i *RColorBrewer* knjižnice.

Sva računalna i grafička obrada učinjena je u R4.3.1 programu (<https://www.R-project.org>).

5. Rezultati

5.1. Deskriptivna analiza

Demografska i klinička obilježja majki i dojenčadi prikazana su u Tablici 5.1.

U obje skupine majke su slične dobi i sličnog leukograma. U 6 majki evidentirana je povijest kronične bolesti, poglavito autoimune ili upalne naravi (Hashimotov tiroiditis, vulgarna psorijaza, hepatitis B; n=4), uz pojedinačne slučajeve hipertenzije i trombofilije. Sve su trudnoće uredno kontrolirane, a djeca su uglavnom terminski porođena, zdrava, uz Apgar >7/10, s jednim izuzetkom (min. Apgar 5/10, kontrolna skupina). Postpartalni tijek je bio uredan u svih ispitanica, kao i psihomotorni razvoj djeteta. Među bitnim razlikama, u kontrolnoj skupini (zdrava djeca) zastupljene su većinski prvorotke, uglavnom najkraće laktacijske dobi (≤ 3 mj./ >3 mj., 9/6 vs. 5/20, Fisher P=0.026), a većina dojenčadi hranjena je isključivo majčinim mlijekom sa ili bez nadohrane adaptiranim mlijekom (Tablica 5.1). U poredbenoj skupini s oboljelom djecom, naprotiv, prvorotke i višerotke podjednako su zastupljene, laktacijska je dob značajno viša, a prehrana raznovrsnija, poglavito na račun većeg udjela dohrane.

Ukupan broj opažanja također znatno varira s laktacijskom dobi: veći je za rani interval (≤ 5 mj., n=25), a gotovo svi podaci za laktacijsku dob >5 mjeseci dolaze od oboljelih beba.

Među dojenčadi u akutnom infektu, povišen serumski CRP (>5 mg/L) zabilježen je u 9 slučajeva, a među njihovim majkama u 3 slučaja. CRP >30 mg/L pronađen je u 4 dojenčadi. Febrilitet je registriran u 14 oboljele dojenčadi, dok su sve majke bile asimptomatske.

Tablica 5.1. Demografska, klinička i biokemijska obilježja majki i njihove dojenčadi.

Obilježje	Oboljeli (N=26)	Zdravi (N=15)	p*
Dob majke (god., medijan [Q1, Q3])	32 [30, 33.3]	31 [30, 34]	0.585
[Min, Max]	[24, 39]	[25, 4]	-
Laktacijska dob (mj.)	6 [4, 7.3]	3 [3, 4]	0.02
	[1, 15]	[2, 10]	-
Spol djeteta (M/Ž, N)	13/13	10/5	0.346**
Porod (terminski/<37 tj., N)	3/22	0/15	0.279**
Nadohrana (mm/+am/+ostalo, N)	12/2/11	8/4/3	-
Dohrana (mm±am/+ostalo, N)	14/11	12/3	0.177**
Vrsta poroda (<i>per vias</i> /sc, N)	19/6	10/5	0.716**
Pušač (Da/Ne)	4/21	1/14	0.633**
Kronična bolest majke (Da/Ne)	5/20	1/14	0.381**
Broj poroda (unipara/multipara, N)	13/12	13/2	0.04**
L majke (x10 ⁹ /L)	7.2 [5.8, 7.6]	6.4 [5.6, 8]	0.714
	[4.40, 9.2]	[4.8, 11.7]	-
L djeteta (x10 ⁹ /L)	10.1 [6.8, 12.3]	-	-
	[4.30, 15.5]	-	-
CRP majke (mg/L)	1.65 [0.4, 3.4]	2.1 [1.1, 3.33]	0.323
	[0.2, 17.2]	[0.6, 5.8]	-
CRP djeteta (mg/L)	2.15 [0.4, 19.2]	-	-
	[0.1, 139]	-	-
Febrilitet djeteta (Da/Ne, N)	14/11	-	-

Q kvartila, mm majčino mlijeko, am adaptirano mlijeko, *per vias* vaginalni porod, sc carski rez, L leukociti u perifernoj krvi, CRP C reaktivni protein

* Mann-Whitney test, ** Fisher exact test

5.2. Imunofenotipizacija

Dominantno obilježje staničnih frekvencija u mlijeku je njihova visoka varijabilnost, bez uvjerljive evolucije staničnih profila tijekom laktacije (rana vs. kasna laktacija, podaci nisu prikazani), zbog čega su citometrijski podaci za oboljele skupno analizirani.

U općim karakteristikama, $CD4^+$ stanice brojnije su od $CD8^+$ stanica u T populaciji [CD4/CD8 omjer, 1.9 (1.53-2.38), svi uzorci], a $V\delta 2^+$ i $V\delta 1^+$ stanice pokazuju promjenjiv omjer [zdravi, n=6, 2.5 (0.7-6.3); oboljeli, n=22, 0.83 (0.46-2.92), $V\delta 2^+/V\delta 1^+$, prvo mjerenje], u obje faze bez značajne razlike među oboljelima i zdravima (podaci nisu prikazani). U oboljelih, faza oporavka obilježena je značajnim padom $V\delta 2^+/V\delta 1^+$ omjera [0.8 (0.36-2.28) vs. 0.55 (0.25-1.25), akutna faza vs. oporavak, Wilcoxon $P=0.035$, n=19] u parnim mjerenjima.

U akutnoj fazi, prisutna je marginalna, ali značajna razlika u udjelu $CD8^+$ T stanica, i to na račun smanjenja u mlijeku majki oboljele djece u usporedbi sa zdravim kontrolama Slika 5.1, Tablica 5.2). U oporavku, udio $CD8^+$ T stanica značajno raste (Wilcoxon $P=0.037$, oporavak vs. akutna faza, parna usporedba), približavajući se ponovno kontrolnim proporcijama. Istodobno, ovaj porast udjela $CD8^+$ T stanica tijekom oporavka praćen je zrcalnim padom udjela $CD4^+$ T stanica (Wilcoxon $P=0.019$, oporavak vs. akutna faza) u istim uzorcima. Rezultat je značajan pad CD4/CD8 omjera u konvalescentnoj fazi [2 (1.8-2.5) vs. 1.6 (1.3-1.9), akutna faza vs. oporavak, n=19, $P=0.019$] u parnim mjerenjima. U fazi oporavka, vidljivi su također relativno niži udjeli $CD3^+$ limfocita i NKT stanica za oboljelu djecu u usporedbi s kontrolama u istom intervalu, no bez značajnog hoda frekvencija između akutne i konvalescentne faze oboljelih (Tablica 5.2). Za preostale populacije, nije pronađena robustna razlika staničnih profila u mlijeku majki oboljele i zdrave djece.

Među ostalim analiziranim obilježjima majki i dojenčadi, izdvajaju se poveznice s upalnim biljezima majke i djeteta: viši CRP djeteta povezan je s višim udjelom $\gamma\delta T$ stanica ($R=0.64$, $P=0.0013$, n=22, % parent) u mlijeku tijekom akutne faze bolesti, a u oporavku zapažen je pad frekvencije $CD3^+V\delta 2^+$ stanica u djece s višim leukocitima ($R=-0.45$, $P=0.044$, n=20, % parent). Nadalje, viši CRP majke povezan je s nižim udjelom $CD8^+$ T stanica u mlijeku tijekom akutne faze bolesti dojenčeta ($R=-0.62$, $P=0.0042$, n=19), a viši leukociti majke s višim udjelom NK stanica tijekom oporavka ($R=0.61$, $P=0.0073$, n=18, % parent).

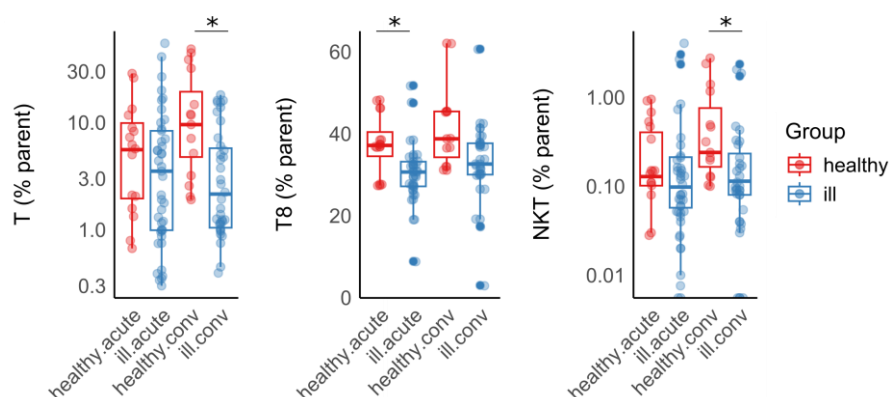
Za oboljelu dojenčad, stanični sastav i profil imunoglobulina mlijeka majke također su međusobno su povezani.

U fazi oporavka, razina IgG2 ($R=0.56$, $P=0.02$, $n=17$) i IgM ($R=0.59$, $P=0.011$, $n=18$) u mlijeku pozitivno korelira s brojnošću $CD4^+$ T stanica (% singlet). Razina IgM u oporavku dodatno je povezana s udjelom T stanica ($R=0.6$, $P=0.0085$, $n=18$) i B stanica ($R=0.59$, $P=0.0097$, $n=18$, % parent).

U obje faze, razina IgA povezana je pozitivno s udjelom i brojnošću $V\delta 2^+$ stanica u mlijeku: kako u akutnoj fazi bolesti ($R=0.65$, $P=0.0033$, $n=18$, % parent), tako i u oporavku $R=0.63$, $P=0.0063$, $n=17$, % singlet).

Za ostale Ig klase, zastupljenost različitih vrsta $\gamma\delta$ T stanica u mlijeku uglavnom inverzno zrcali Ig koncentracije. U akutnoj fazi, udio $\gamma\delta$ T stanica u $CD3^+$ populaciji opada s višim koncentracijama IgM ($R=-0.69$, $P=0.0015$, $n=18$) i IgE ($R=-0.58$, $P=0.012$, $n=18$). Nadalje, udio $V\delta 1^+$ stanica negativno korelira s razinom IgG2 ($R=-0.75$, $P=0.00088$, $n=18$, % parent).

U oporavku, udio $V\delta 2^+$ stanica u T populaciji opada s rastom IgG1 ($R=-0.57$, $P=0.017$, $n=17$).



Slika 5.1. Distribucija staničnih frekvencija za izabrane populacije po skupini i fazi bolesti.

Kutijasti dijagrami, horizontalna linija označava medijan, a graničnici prvu (Q1) i treću kvartilnu (Q3). T-linije obuhvaćaju $1.5 \times IQR$ (interkvartilni raspon, $Q3-Q1$). Svaka točka odgovara jednom uzorku. Izabrane P-vrijednosti odgovaraju neparnim usporedbama (Mann-Whitney test). Prikazane su samo značajne P-vrijednosti (* $P < 0.05$).

Tablica 5.2. Protočna citometrija, frekvencije izabranih populacija stanica u mlijeku majke, podjela prema statusu dojenčeta i fazi bolesti. Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Stanice (% Parent)	Faza	Zdravi	n	Oboljeli	n	P*
Limfociti	akutna/1. mjerenje	21.2 (16.9-28.5)	8	22.7 (16.1-29.6)	21	0.864
	oporavak/2. mjerenje	27.9 (14.1-29.5)	7	23.5 (13.9-25.7)	19	0.418
B	akutna/1. mjerenje	0.29 (0.07-0.38)	8	0.12 (0.03-0.39)	21	0.45
	oporavak/2. mjerenje	0.22 (0.19-1.16)	7	0.12 (0.05-0.35)	19	0.132
T	akutna/1. mjerenje	5.8 (1.8-12.6)	8	3.9 (1-11.5)	21	0.54
	oporavak/2. mjerenje	9.8 (3.3-33.2)	7	3.8 (1.1-10.7)	19	0.105
CD3 ⁺ limfociti	akutna/1. mjerenje	5.7 (1.8-12.3)	8	3.9 (1.1-11.3)	21	0.574
	oporavak/2. mjerenje	9.8 (3.3-33)	7	3 (1-8.5)	19	0.043
CD3 ⁺ CD8 ⁺	akutna/1. mjerenje	37.1 (30-44.3)	8	30.7 (26.7-33.8)**	21	0.048
	oporavak/2. mjerenje	38.8 (32-45.5)	7	32.6 (29.8-37.9)	19	0.093
CD3 ⁺ CD4 ⁺	akutna/1. mjerenje	58.1 (50.5-63.4)	8	61.6 (57-66.2)	21	0.272
	oporavak/2. mjerenje	52.9 (50-58.7)	7	57.8 (51.4-62.2)	19	0.247
NK	akutna/1. mjerenje	0.7 (0.6-1.6)	8	0.7 (0.3-1.4)	21	0.494
	oporavak/2. mjerenje	0.8 (0.6-3.4)	7	0.8 (0.4-2.3)	18	0.65
NKT	akutna/1. mjerenje	0.1 (0.09-0.6)	8	0.08 (0.05-0.22)	21	0.317
	oporavak/2. mjerenje	0.24 (0.13-1.17)	7	0.1 (0.04-0.24)	18	0.039
γδT	akutna/1. mjerenje	0.16 (0.07-8.6)	6	0.11 (0-0.54)	22	0.632
	oporavak/2. mjerenje	0.52 (0.18-0.81)	6	0.21 (0.09-0.75)	20	0.287
CD3 ⁺ Vδ1 ⁺	akutna/1. mjerenje	1.16 (0.5-2.9)	6	1.4 (0.9-3.1)	22	0.341
	oporavak/2. mjerenje	1.68 (1.1-2.7)	6	2 (1.2-3.7)	20	0.394
CD3 ⁺ Vδ2 ⁺	akutna/1. mjerenje	2.5 (1.6-3.2)	6	1.6 (0.7-3.5)	22	0.37
	oporavak/2. mjerenje	1.9 (0.8-3.4)	6	1 (0.6-2.7)	20	0.626

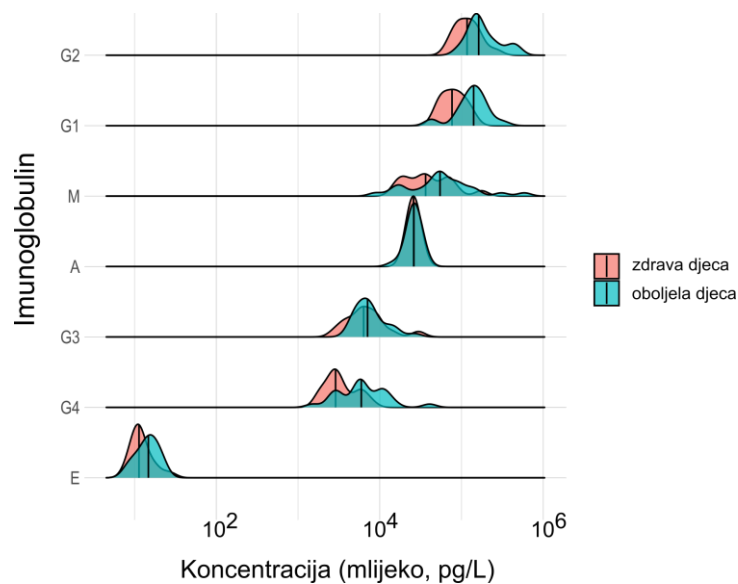
* Mann-Whitney test, ** crveni tekst obilježava značajnu razliku parnih mjerenja (Wilcoxon test, P<0.05)

5.3. Distribucija imunoglobulina u humanom mlijeku

Ig klase bitno se razlikuju svojom zastupljenošću i tipičnim masenim koncentracijama, koje u ljudskom mlijeku variraju preko 4 reda veličine (Slika 5.2). Razlike koncentracija su poglavito prisutne između pojedinih klasa, u manjem opsegu i unutar pojedinih klasa Ig.

IgE je najoskudnije zastupljen, a slijede ga - u rastućem nizu - IgG4 i IgG3. Tipično za sekretorne produkte, IgA je snažno zastupljen, a najviše masene koncentracije postižu IgG2, IgG1 i IgM. Istovjetan redoslijed prisutan je u obje skupine majki, neovisno o statusu čeda

(Slika 5.2). Za ukupni IgG, udio pojedinih IgG klasa izrazito je stabilan, kako među grupama, tako i između dva mjerenja (Tablica 5.3).



Slika 5.2. Razdioba masenih koncentracija imunoglobulinskih klasa u mlijeku majki prema skupinama, svi uzorci, prvo mjerenje.

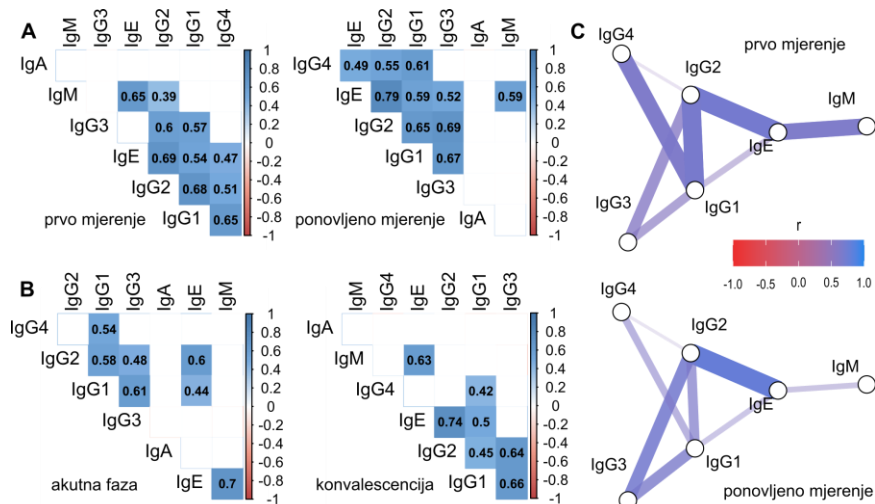
Vertikalne linije označavaju medijan. Apsisa je log os.

Tablica 5.3. Udjeli (%) pojedinih klasa (G1-G4) u ukupnom IgG, mlijeko majki

Akutna faza		Prvo mjerenje	Konvalescencija	Drugo mjerenje
Klasa	Oboljeli (% IgG)	Zdravi (% IgG)	Oboljeli (% IgG)	Zdravi (% IgG)
G1	41.4 (34.8-45.7)	37.6 (33-43.4)	35.6 (30.7-45.7)	39.3 (35.6-45.1)
G2	54.4 (50-62.7)	57.7 (51.1-62.2)	57.7 (49.3-65.2)	55.3 (50.7-61.9)
G3	2.3 (1.7-2.9)	3.1 (2.4-4)	2.6 (1-3.2)	3.1 (2.5-3.7)
G4	1.7 (1.1-2.7)	1.4 (1.2-1.8)	1.7 (1.2-2.3)	1.4 (1.3-1.8)

Imunoglobulni klase G obilježeni su snažnom pozitivnom povezanošću među pojedinim razredima (G1-G4), i njihove koncentracije slijede slične obrasce varijacija među ispitanicima. Koncentracije IgM i IgE snažno su pozitivno korelirane, unatoč različitim skalama, a koncentracija IgE zrcali IgG2, u manjem opsegu i IgG1 (Slika 5.3A-B). Ovi temeljni principi prepoznatljivi su u obje vremenske točke (Slika 5.3C), kako u akutnoj fazi bolesti djeteta, tako i u konvalescentnoj fazi (Slika 5.3B).

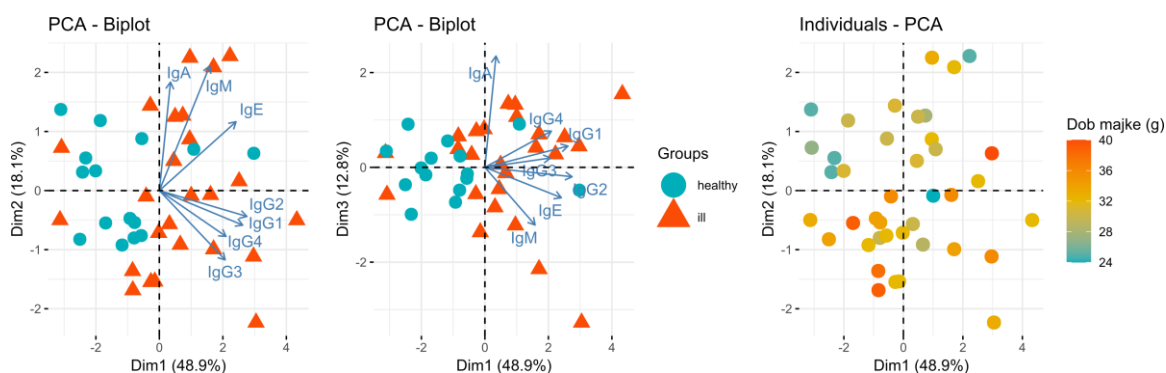
Za ponovljenim mjerenja u kontrolnom intervalu, najsnažnija povezanost i postojanost mjerenja zabilježena je za IgM ($R=0.90$), IgG4 ($R=0.75$), IgG1 ($R=0.63$) i IgG2 ($R=0.63$). Slijede ih IgE ($R=0.59$), potom IgG3 ($R=0.52$) i IgA ($R=0.42$, svi $P<0.05$), čije su koncentracije najslabije povezane u ponovljenom umjeravanju. Ovakav redoslijed snage povezanosti u parnim mjerenjima dijelom je podudaran s redoslijedom zastupljenosti IgG klasa u mlijeku, što vjerojatno upućuje na postupno osipanje preciznosti mjerenja s padom koncentracije analita (osobito u području LLOQ).



Slika 5.3. Toplinska mapa, korelacijska analiza

A) povezanost među imunoglobulinskim klasama u ponovljenim mjerenjima (svi uzorci, Spearmanovi koeficijenti, $P < 0.05$). B) Povezanost među imunoglobulinskim klasama u akutnoj i konvalescentnoj fazi (Spearmanovi koeficijenti, mlijeko majki s oboljelim djecom, $P < 0.05$). C) Mrežna korelacija rangova (r), za sve asocijacije s korigiranim $P < 0.001$ (svi uzorci).

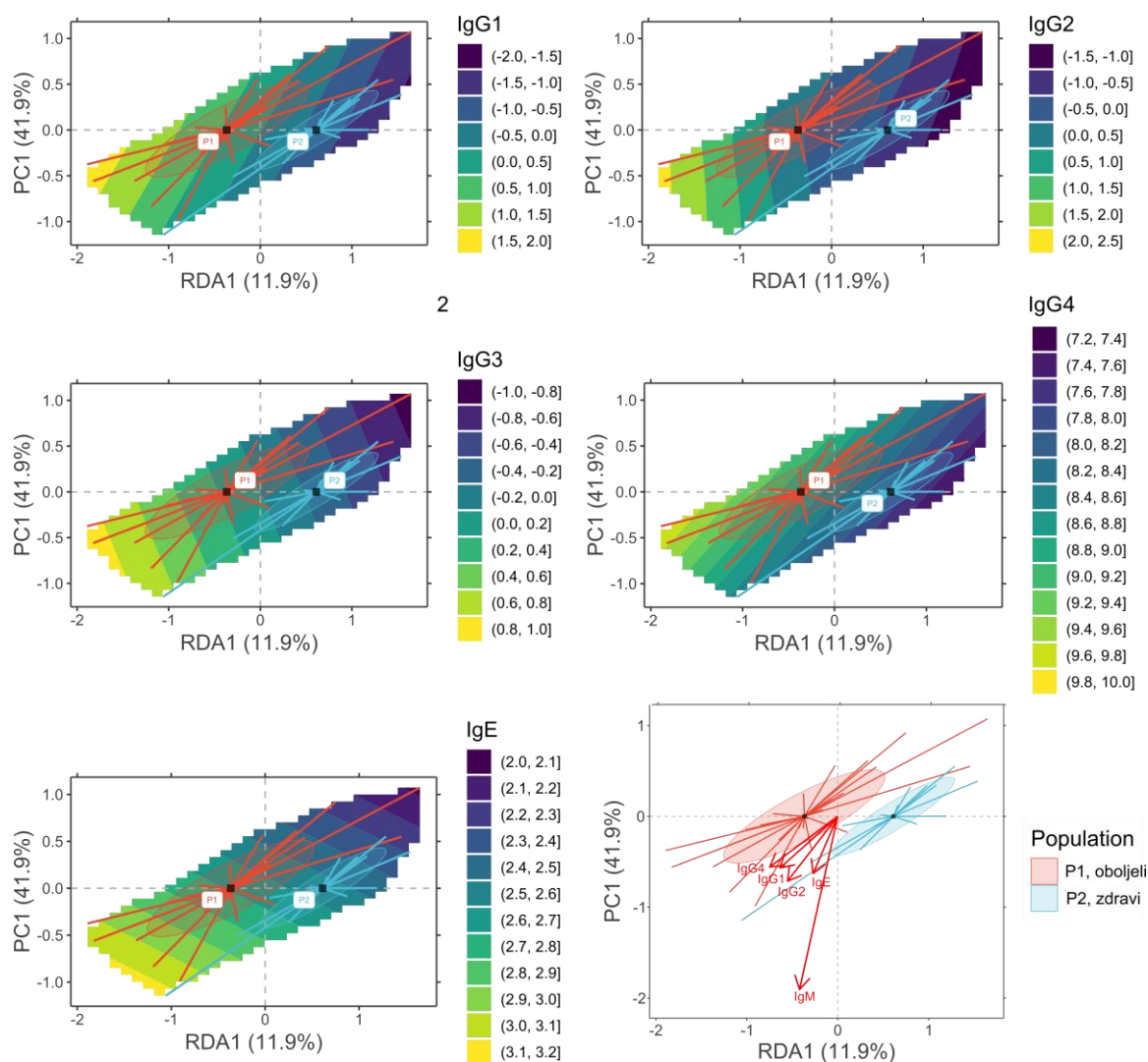
5.4. Globalni pregled



Slika 5.4. Analiza glavnih komponenti (PCA) za imunoglobulinski profil

Svi uzorci, prvo mjerenje.

Veza između akutnog infekta djeteta i globalne promjene Ig profila mlijeka majke ispitana je analizom glavnih komponenti. U PCA, vidljivo je grupiranje i segregacija uzoraka mlijeka prema statusu djeteta duž prve glavne komponente (PC1, zdrava vs. oboljela), koja prima najveći doprinos iz IgG1, IgG2 i IgE (Slika 5.4). Nadalje, koincidentni porast dobi majke duž prve komponente ($R=0.52$, $P=0.00052$, $n=40$) ukazuje na moguću ulogu u oblikovanju Ig profila mlijeka pojedinih skupina. Analiza redundancije jasno ilustrira separaciju grupa duž gradijenta IgG1, IgG2, i IgG4, odnosno IgE (Slika 5.5), potvrđujući razliku u Ig profilu između dvije grupe ispitanica ($F_{1,38}=5.134$, $P=0.0035$, 99999 permutacija, $R_a^2 = 9.6\%$). Pri tom, udio statusa čeda u ukupnoj varijanci Ig profila relativno je skroman ($<10\%$).

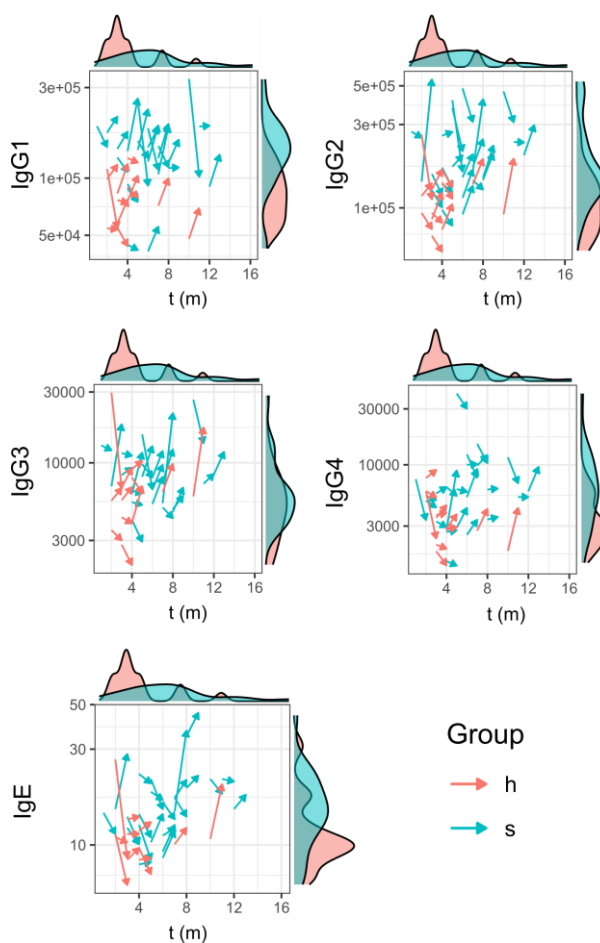


Slika 5.5. Analiza redundancije (RDA)

Svi uzorci, prvo mjerenje. PC glavna komponenta (*principal component*). Kolorne skale kodiraju serumsku masenu koncentraciju pripadnog imunoglobulina (log-skala). Ordinacijske elipse omeđuju standardnu devijaciju točaka. Radijalne linije povezuju centroid pripadne grupe s točkama (uzorcima/ispitanicima). Prikazani su samo vektori s >40 % udjelom u varijanci.

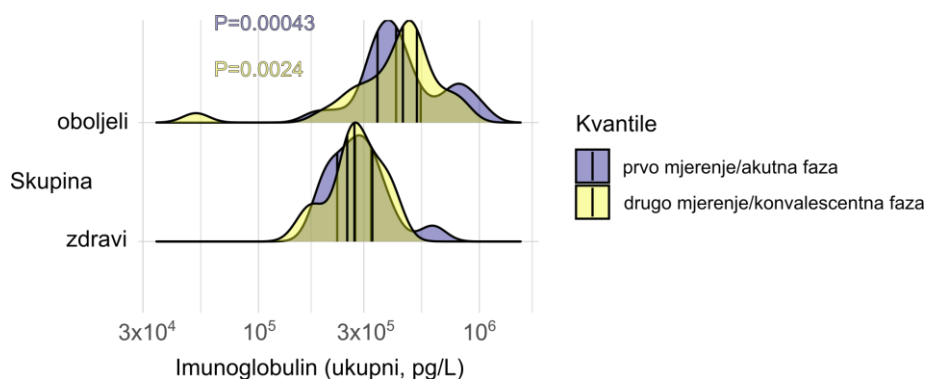
Unatoč razlici u broju višerotki među skupinama, nema razlike u koncentraciji Ig po paritetu za nijedan Ig, u nijednoj fazi (podaci nisu prikazani).

Majke porođene *per vias* i carskim rezom imaju sličan Ig sastav mlijeka (podaci nisu prikazani).



Slika 5.6. Vektorska polja

Individualna dinamika parnih mjerenja (pg/L) u vremenu (t, mjeseci) s marginalnim distribucijama po statusu za izabrane Ig klase. Svaka strelica (vektor) odgovara jednom ispitaniku, i omeđena je prvim i kontrolnim mjerenjem pripadnog Ig u razmaku od mjesec dana (mlijeko majke). Marginalne distribucije temeljene su na prvom mjerenju, a boja odgovara statusu djeteta (zdravo vs. oboljelo). Ordinate su log osi.



Slika 5.7. Razdioba masenih koncentracija ukupnog imunoglobulina u mlijeku po skupinama i vremenu.

Vertikalne linije označavaju (redom, s lijeva nadesno) 25., 50. (medijan) i 75. percentilu. Apscisa je log-os.

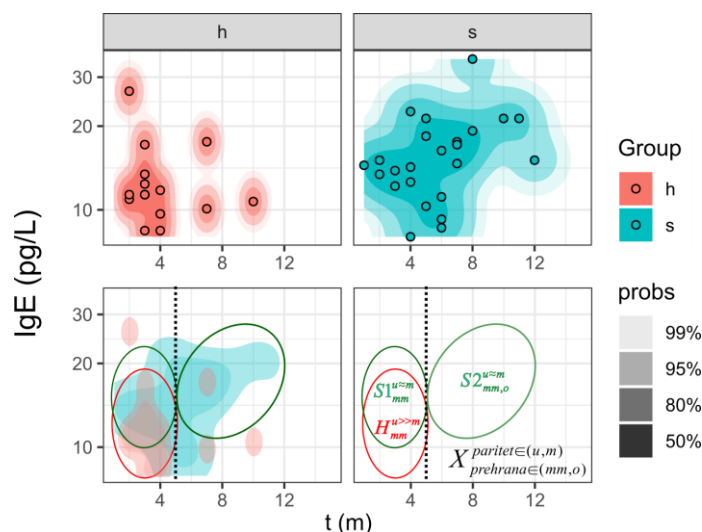
5.5. Koncentracija imunoglobulina u mlijeku, usporedba između majki s oboljelom i majki sa zdravom djecom

Detalji dinamike pojedinih Ig klasa u vremenu i prema skupinama prikazani su Slikom 5.6.

Mlijeko majki s oboljelom dojenčadi obilježeno je povišenom razinom ukupnog Ig kako u akutnoj, tako i u konvalescentnoj fazi (Slika 5.7.), i to prvenstveno na račun selektivnog, asimetričnog neto-porasta pojedinih klasa Ig. Koncentracija IgE, IgG1, IgG2 i IgG4 značajno je viša u mlijeku majki čije je dojenče u akutnom infektu nego u mlijeku majki sa zdravim djetetom (Slika 5.2, Tablica 5.5; Slika 5.6, marginalne distribucije). Osim u akutnoj fazi, ova razlika perzistira u konvalescenciji, do kraja prvog mjeseca nakon infekta (Tablica 5.5). Za IgA i IgM, koncentracije u mlijeku slične su u obje skupine majki duž cijelog trajanja istraživanja, barem u nestratificiranoj analizi.

Izravna usporedba Ig profila ovih skupina, međutim, otežana je razlikama u laktacijskoj dobi, paritetu majki, i prehrani između zdrave i oboljele djece (Tablica 5.2). Kasniji laktacijski interval osobito je karakteriziran nedostatkom opažanja za skupinu zdrave djece, i gotovo svi podaci za laktacijsku dob >5 mj. dolaze od oboljele dojenčadi (Slika 5.4). U takvim uvjetima, particija ili segmentiranje multidimenzionalnog parametarskog prostora u povezane regije sličnih svojstava može olakšati nepristranu usporedbu među neovisnim skupinama. U tu svrhu, i za potrebe detaljne raščlambe kolektivnih rezultata, uzorci mlijeka raslojeni su prema

laktacijskoj dobi s graničnikom ≤ 5 mj., čime su unaprijeđeni izgledi da su nastale skupine korektno predstavljene postojećom mrežom opažanja (Slika 5.8, za ilustraciju je korišten IgE). Dodatna homogenizacija postignuta je separatnom analizom za akutnu fazu i konvalescentnu fazu.



Slika 5.8. Bivarijatne mape gustoće opažanja za IgE, odvojeno prema statusu djeteta.

Opazanja za uzorke mlijeka majki s oboljelom (s) i zdravom djecom (h) potiču iz različitih vremenskih okvira (t, mjeseci) i zauzimaju različite dijelove parametarskog prostora. Donji red: particija prostora prema dobi (vertikalna točkasta linija, 5. mj laktacije) i statusu (H zdravi, S oboljeli) u regije sličnih svojstava. Superskript i subskript u nazivu skupine opisuju paritet majke (u=unipare, m=multipare) i prehranu djeteta [mm majčino mlijeko, ostalo (o)=dohrana] u predmetnoj skupini. Ordinata je log-os.

U tako raslojenim skupinama, kvalitativno prevladavaju dva različita obrasca kolektivne dinamike Ig klasa: IgG1 i IgG2 pokazuju sličnu kinetku u ranoj i kasnoj laktaciji, i u oba laktacijska intervala povišeni su već u akutnoj fazi, uz relativno ograničenu dodatnu evoluciju u konvalescentnoj fazi (Slika 5.9A, gornji red; Slika 5.10).

Nakon stratifikacije po laktacijskoj dobi (rana laktacija, Slika 8, H vs. S1 usporedba, Tablica 4) i dalje je prisutna značajno viša razina IgG1 ($P=0.0043$) i IgG2 ($P=0.011$) u mlijeku majki s djetetom u akutnoj fazi bolesti ($n=12$) u usporedbi sa majkama zdrave djece podudarne

dojenačke dobi, [≤ 5 mj., 3 (2.3-3.8) vs. 4 (2.3-4.8) mj., $n=12+12$, zdravi vs. oboljeli, $P=0.22$], sličnog redoslijeda poroda [2/10 vs. 7/5, zdravi vs. oboljeli, m/u , $P=0.09$], identične prehrane, i sličnog izlaganja duhanskom dimu [1/11 vs. 3/9, Da/Ne, $P=0.59$]. U konvalescentnoj fazi, perzistira viša razina mliječnog IgG2 ($P=0.045$), ali ne i IgG1 u usporedbi s kontrolnim mjerenjem u skupini zdrave djece, uz slične razine svih preostalih klasa Ig u obje skupine. Unatoč smanjenju statističke snage, time je robustno potvrđena neovisna promjena IgG1 i IgG2 profila mlijeka majke u infektu djeteta, prvenstveno u ranoj dojenačkoj dobi. Pri tom, preostale zapažene razlike u obilježjima među nestratificiranim skupinama (Tablica 5.2) ne čine se niti nužnim niti dovoljnim za promjenu Ig sastava mlijeka majke, barem ne IgG1 i IgG2 klase (Tablica 5.7). Analiza redundancije, u kojoj razlika za IgG1 i IgG2 perzistira nakon kontrole za latentne disproporcije u laktacijskoj dobi između dvije skupine majki, potvrđuje ovaj zaključak (Tablica 5.4, nestratificirana analiza).

Za kasnu laktaciju (>5 mj.), direktna usporedba Ig profila mlijeka majki zdrave i oboljele dojenčadi preostaje za buduće istraživanje, prvenstveno zbog nedostatka podudarne kontrolne skupine u ovom istraživanju.

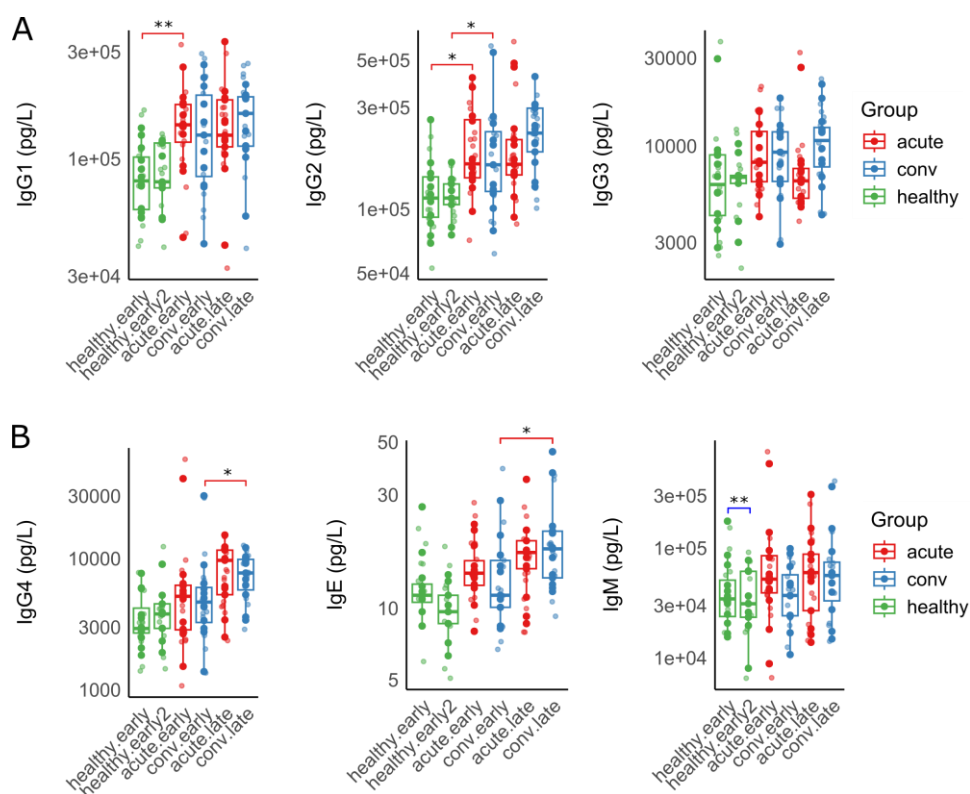
Tablica 5.4. Analiza redundancije, kondicionalni učinci, usporedba Ig profila mlijeka majki zdrave i oboljele djece.

Ig	Prvo mjerenje-akutna faza		Drugo mjerenje-konvalescencija			
	(df=1,37)		(df=1,28)			
	Skupina Dob		Skupina Dob		Dob Skupina	
	F	P	F	P	F	P
G1	13.02	0.0011	5.56	0.024	0.45	0.496
G2	7.87	0.0086	5.15	0.024	13.16	0.003
G4	7.18	0.011	2.81	0.108	1.55	0.221
E	2.55	0.121	1.88	0.188	17.303	0.002

F F-statistika, df broj stupnjeva slobode (*degrees-of-freedom*), P P-vrijednost (9999 permutacija).

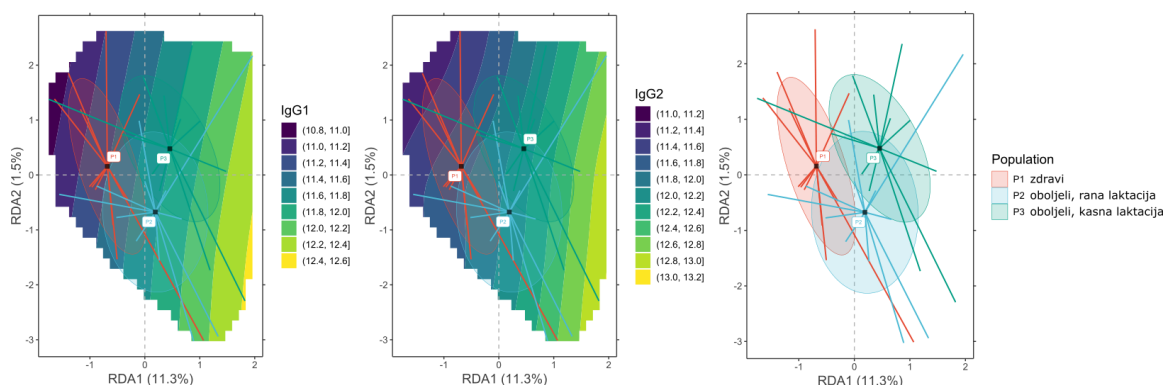
Za razliku od IgG1 i IgG2, dinamika IgE i IgG4 varira s trajanjem laktacije, formirajući (pseudo)gradijent u vremenu: oba slijede postupni porast od rane prema kasnoj laktaciji, kada postižu značajno više vrijednosti u usporedbi sa ranim laktacijskim intervalom. Pri tom, oba kulminiraju u oporavku: IgG4 raste dijelom već u akutnoj fazi, uz dodatnu konsolidaciju u konvalescentnoj fazi kasne laktacije, dok je porast IgE odgođen i jasnije izražen u oporavku nego akutnoj fazi (Slika 5.9B, donji red).

Na taj način, rana laktacija obilježena je dinamikom IgG1 i G2, kojoj se u kasnoj laktaciji pridružuju i IgE, odnosno IgG4. Detalji vremenske dinamike Ig ispitani su i prikazani u sljedećem poglavlju.



Slika 5.9. Razdioba masenih koncentracija Ig klasa u mlijeku po skupinama i vremenu.

Kutijasti dijagrami, prikazane su razdiobe za ranu i kasnu laktaciju, zasebno za akutnu i konvalescentu fazu (parna mjerenja). Horizontalna linija označava medijan, a graničnici prvu (Q1) i treću kvartil (Q3). T-linije obuhvaćaju $1.5 \times \text{IQR}$ (interkvartilni raspon, $Q3 - Q1$). Svaka točka odgovara jednom uzorku. Izabrane P-vrijednosti odgovaraju parnim (*Wilcoxon test*) i neparnim usporedbama (*Mann-Whitney test*). Prikazane su samo značajne P-vrijednosti (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Ordinata je log-os.



Slika 5.10. Analiza redundancije (RDA), mjerenja akutne faze (IgG1 i IgG2)

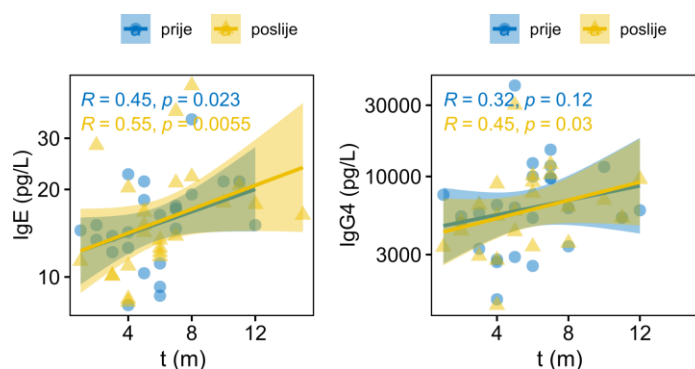
Usporedba rane i kasne laktacije. Kolorne skale kodiraju serumsku masenu koncentraciju pripadnog imunoglobulina (log-skala). Ordinacijske elipse omeđuju standardnu devijaciju točaka. Radijalne linije povezuju centroid pripadne grupe s točkama (uzorcima/ispitanicima). Za oboljele, centroidi rane i kasne laktacije pripadaju istoj izokonturnoj vrpci IgG1 i IgG2.

5.6. Longitudinalne promjene sastava mlijeka u oboljele djece (usporedba rane i kasne laktacije)

Promjene Ig profila s duljinom dojenja analizirane su za uzorke mlijeka majki oboljele djece koji premošćuju ranu i kasnu laktaciju sve do 15 mj. života djeteta (Slika 5.8, S1 vs. S2 usporedba). Uzorci iz kohorte zdrave djece izostavljeni su iz analize jer obuhvaćaju samo kratak interval najranije laktacije, čija je reprezentativno populirana duljina zanemarivo kratka u usporedbi s trajanjem dojenjačke dobi.

U demografskom i kliničkom smislu, oboljela djeca iz rane i kasne dojenjačke dobi i njihove majke slični su u glavnini analiziranih obilježja, uz neizbježne razlike u prehrani djeteta (0/12 vs. 10/2, mm+o/mm, rana vs. kasna dojenjačka dob, $P=6.7 \times 10^{-5}$), ali i prevalenciji febriliteta (3/9 vs. 10/2, Da/Ne, rana vs. kasna dojenjačka dob, Fisher $P=0.012$). Naime, starija dojenčad (>5 mj.) češće je bila febrilna u akutnoj fazi nego mlađa, uz trend višeg serumskog CRP [8.5 (0.8-39.3) vs. 0.5 (0.3-4.3) mg/L, 14 vs 12, $P=0.057$].

U takvom ustroju, korelacijska analiza ukazuje na značajnu dinamiku pojedinih Ig klasa s duljinom laktacije, osobito u konvalescentnoj fazi, pri čemu dulju laktaciju prati viša razina IgE i IgG4 u mlijeku majki (Slika 5.11). Stratificirana analiza potvrđuje ovaj rezultat: u konvalescentnoj fazi IgE [11.3 (10.1-16.7) vs. 17.8 (13-21.6) pg/L, 11 vs. 13, $P=0.037$] i IgG4 [4.7 (3-6.3) vs. 7.8 (5.3-10.1) ng/L, 12 vs. 11, $P=0.045$] postižu značajno više vrijednosti u kasnoj nego u ranoj laktaciji, a razlika za IgE osobito je robustna u multivarijantnoj analizi (Tablica 5) i analizi redundancije ($F_{1,22}=4.48$, $P=0.046$, 99999 permutacija). U akutnoj fazi, IgG4 postiže nešto više vrijednosti u kasnoj nego u ranoj laktaciji, no ta razlika nije postigla značajnost [5.2 (2.8-6.4) vs. 9.7 (5.3-11.7) ng/L, rana vs. kasna dojenačka dob, $P=0.077$, Slika 9B]. Za ostale Ig klase, uključujući IgE, nema značajnih razlika između rane i kasne laktacije u masenim koncentracijama akutne faze.



Slika 5.11. Korelacija rangova (mlijeko majki oboljele djece)

Dinamika izabranih Ig klasa u laktacijskom vremenu (t, mjeseci), zasebno za svaki niz mjerenja (prije=akutna faza, poslije=konvalescencija). Regresijski pravac je definiran metodom najmanjih kvadrata s 95 % intervalom pouzdanosti u sjenčanoj vrpci. R = Spearman rho. Ordinata je log-os. Svaka točka odgovara jednoj majci.

Konačno, unatoč disparatnoj prehrani u dvije dojenačke dobi, nema robustne razlike u razini Ig po dohrani (podaci nisu prikazani).

5.7. Parne usporedbe u kontrolnom intervalu

Za ponovljena mjerenja i parne usporedbe unutar dviju skupina majki, nije bilo značajnih promjena u koncentraciji Ig u kontrolnom intervalu (1 mjesec), niti u majki sa zdravom djecom, niti u majki s oboljelim djecom (nestratificirana analiza, Tablica 5.5).

Za parne usporedbe u ranoj dojenačkoj dobi (≤ 5 mj., stratificirana analiza u homogenim skupinama), za zdravu djecu očekivano nisu zabilježene značajne promjene Ig sastava u kratkom kontrolnom intervalu.

Za oboljelu djecu u ranoj dojenačkoj dobi, zabilježen je značajan pad koncentracije IgM u kontrolnom intervalu između akutne i konvalescentne faze [51.1 (35.4-91.8) vs. 37 (23.9-68.1) ng/L, $P=0.0067$], bez znakova dodatne dinamike u ostalim Ig klasama (Tablica 4).

U oboljele djece u kasnoj dojenačkoj dobi, nisu zabilježene robustne promjene koncentracije Ig u kontrolnom intervalu između akutne i konvalescentne faze (Slika 5. 9).

5.8. Povezanost Ig profila mlijeka s demografskim, kliničkim i biokemijskim obilježjima majke i djeteta

IgM i CRP oboljelog djeteta slijede inverzni obrazac: viša koncentracija IgM u mlijeku majke povezana je s nižom koncentracijom CRP u serumu djeteta. Isti rezultat perzistira za mjerenja IgM u obje vremenske točke, i u akutnoj fazi ($R=-0.49$, $P=0.012$, $n=25$) i u konvalescenciji ($R=-0.5$, $P=0.017$, $n=22$), što umanjuje mogućnost slučajnog, lažno-pozitivnog rezultata.

Sličan obrazac vidljiv je i za leukocite oboljelog djeteta: viša koncentracija IgM ($R=-0.41$, $P=0.039$, $n=25$) i IgA ($R=-0.42$, $P=0.035$, $n=25$) u mlijeku majke povezana je sa značajno nižim brojem L u krvi djeteta u akutnoj fazi, a relacija između L djeteta i IgM perzistira marginalno i u konvalescenciji ($R=-0.4$, $P=0.062$, $n=22$). Pri tom, za majke s oboljelim djetetom koncentracija IgM u mlijeku ovisi o njezinoj dobi: starije majke imaju niži IgM u mlijeku, i ta je dobna razlika vidljiva o oba mjerenja, kako u akutnoj ($R=-0.4$, $P=0.045$, $n=25$), tako i u konvalescentnoj fazi ($R=-0.53$, $P=0.01$, $n=22$). Dodatno, unatoč malom broju ispitanika, u majki pušača pronađen je konzistentno niži IgG2 u akutnoj [136.1 (100.2-153.8) vs. 171.5 (145.5-269.9) ng/L, pušači vs. nepušači, 4 vs. 20, $P=0.048$] i konvalescentnoj fazi [118.5 (100.9-133.5) vs. 219.2 (170.8-291.3) ng/L, pušači vs. nepušači, 4 vs. 20, $P=0.025$].

nego u majki nepušača. U skupini majki sa zdravom djecom, registriran je jedan pušač, onemogućujući formalnu statističku analizu.

Konačno, febrilitet djeteta u akutnoj fazi povezan je koncentracijom IgG3 u mlijeku majke: majke s afebrilnim djetetom imaju višu razinu IgG3 u mlijeku od majki s oboljelim, ali febrilnim dojenčecom [5.9 (5-8) vs. 8.3 (6.6-13.1) ng/L, febrilni vs. afebrilni, 12 vs. 11, $P=0.046$]. U konvalescentnoj fazi, nema razlika po febrilitetu u razini Ig.

U majki sa zdravom djecom, sastav Ig mlijeka varira s dobi majke, odgovarajući rezultatu PCA: koncentracija IgG2 (prvo mjerenje, $R=0.602$, $P=0.017$, $n=15$) i IgG3 (prvo mjerenje, 0.572 , $P=0.026$, $n=15$) raste s višom dobi, dok koncentracija IgG4 opada s laktacijskom dobi: dulje dojenje povezano je s nižom razinom IgG4 u mlijeku (prvo mjerenje, $R=-0.52$, $P=0.049$, $n=15$).

Serumska razina sistemskih upalnih biljega (CRP) majke nije povezana sa sastavom mlijeka u skupini zdrave djece.

Tablica 5.5. Usporedba mjerenih vrijednosti imunoglobulina (Ig, medijan s intervartilnim rasponom) mlijeka majki za zdravu i oboljelu dojenčad, nestratificirana analiza.

Ig	Oboljeli (N=29, A)		Zdravi (N=16, B)		Neparni*		Parni**	
	Prije (Akutna faza, 1)	Poslije (konvalescencija, 2)	Prije (1)	Poslije (2)	P (A1 vs. B1)	P (A2 vs. B2)	P (A1 vs. A2, case)	P (B1 vs. B2, control)
IgA (ng/L)	26.2 [24.2, 28.4]	26.5 [24.8, 28.0]	25.9 [23.6, 27.7]	25.8 [24.3, 26.7]	0.706	0.322	0.738	0.724
n	25	24	15	12				
IgE (pg/L)	15.1 [12.6, 18.4]	14.7 [11.7, 20.4]	11.3 [10.4, 12.9]	10.8 [8.62, 12.4]	0.025	0.0084	0.808	0.937
n	25	24	15	12				
IgG1 (ng/L)	141 [113, 178]	139 [106, 189]	76.6 [58.8, 101]	78.0 [65.7, 107]	0.00031	0.0033	0.494	0.367
n	25	24	15	12				
IgG2 (ng/L)	162 [144, 238]	204 [133, 257]	117 [92.6, 143]	117 [99.3, 145]	0.0024	0.002	0.659	0.505
n	25	24	15	12				
IgG3 (ng/L)	7.10 [5.40, 8.69]	9.68 [6.72, 12.2]	6.35 [4.93, 9.00]	6.81 [5.68, 9.37]	0.478	0.079	0.091	0.29
n	24	23	15	12				
IgG4 (ng/L)	5.94 [3.41, 9.84]	5.88 [3.94, 9.07]	2.88 [2.62, 4.51]	3.84 [2.79, 4.34]	0.0057	0.014	0.67	0.327
n	25	23	15	12				
IgM (ng/L)	54.6 [33.4, 87.9]	46.8 [25.2, 65.9]	36.4 [22.8, 65.0]	33.3 [25.4, 61.5]	0.23	0.397	0.153	0.456
n	25	24	15	12				

* Mann-Whitney test; ** Wilcoxon test

Tablica 5.6. Usporedba mjerenih vrijednosti imunoglobulina (Ig, medijan s intervartilnim rasponom) mlijeka majki za zdravu i oboljelu dojenčad, rana laktacijska dob (≤ 5 mjeseci).

Ig	Oboljeli (N=12,A)		Zdravi (N=13, B)		Neparni*		Parni*	
	Prije (Akutna faza, 1)	Poslije (konvalescencija, 2)	Prije (1)	Poslije (2)	P (A1 vs. B1)	P (A2 vs. B2)	P (A1 vs. A2, oboljeli)	P (B1 vs. B2, zdravi)
IgA (ng/L)	26 [24, 28]	26 [26, 27]	26 [23, 28]	26 [24, 27]	1	0.275	0.423	0.541
n	12	11	12	10				
IgE (pg/L)	14 [12, 16]	11 [10, 16]	11 [11, 13]	10 [8.6, 11]	0.083	0.13	0.266	0.573
n	12	11	12	10				
IgG1 (ng/L)	140 [120, 170]	130 [84, 190]	80 [59, 100]	78 [60, 110]	0.0043	0.073	0.965	0.838
n	12	11	12	10				
IgG2 (ng/L)	160 [140, 260]	160 [120, 230]	110 [92, 140]	110 [88, 130]	0.01	0.045	0.197	1
n	12	11	12	10				
IgG3 (ng/L)	8.2 [6.4, 12]	9.3 [6.4, 12]	6.2 [4.2, 9.0]	6.8 [4.5, 6.9]	0.157	0.113	1	0.683
n	12	11	12	10				
IgG4 (ng/L)	5.2 [2.9, 6.3]	4.7 [3.3, 6.0]	2.9 [2.7, 4.3]	3.4 [2.5, 4.4]	0.273	0.21	0.41	0.76
n	12	12	12	10				
IgM (ng/L)	52 [39, 85]	37 [24, 58]	34 [24, 52]	33 [24, 55]	0.194	0.504	0.0067	0.126
n	12	11	12	10				

* Mann-Whitney test, ** Wilcoxon test

Tablica 5.7. Generalni linearni model, usporedba oboljelih i zdravih, glavni efekti, zasebno za akutnu i konvalescentnu fazu.

Akutna faza												
Prediktor	log(IgG1)			log(IgG2)			log(IgG4)			log(IgE)		
	β	CI	P	β	CI	P	β	CI	P	β	CI	P
Odsječak	11.32	10.89 – 11.68	<10 ⁻⁶	11.53	11.17 – 11.82	<10 ⁻⁶	7.87	7.16 – 8.42	<10 ⁻⁶	2.29	1.99 – 2.57	<10 ⁻⁶
p [u]	-0.03	-0.38 – 0.30	0.874	0.08	-0.24 – 0.40	0.61	0.21	-0.28 – 0.77	0.366	0.11	-0.08 – 0.33	0.3
Skupina [oboljeli]	0.51	0.14 – 0.80	0.016	0.44	0.13 – 0.75	0.01	0.62	0.19 – 1.12	0.006	0.21	-0.01 – 0.42	0.056
Lakt. dob	-0.01	-0.06 – 0.07	0.828	0.02	-0.03 – 0.08	0.332	0.01	-0.05 – 0.09	0.684	0.03	-0.01 – 0.06	0.156
N	39			39			39			39		
Konvalescencija												
Prediktor	log(IgG1)			log(IgG2)			log(IgG4)			log(IgE)		
	β	CI	P	β	CI	P	β	CI	P	β	CI	P
Odsječak	11.17	10.70 – 11.63	<10 ⁻⁶	11.4	10.98 – 11.71	<10 ⁻⁶	7.96	7.11 – 8.61	<10 ⁻⁶	1.95	1.45 – 2.26	<10 ⁻⁶
p [u]	0.03	-0.33 – 0.43	0.838	0.11	-0.21 – 0.46	0.512	0.01	-0.51 – 0.64	0.972	0.22	-0.03 – 0.55	0.086
Skupina [oboljeli]	0.47	0.12 – 0.77	0.006	0.5	0.14 – 0.87	0.006	0.43	-0.04 – 0.94	0.068	0.37	0.10 – 0.68	0.008
Lakt. dob	0.02	-0.02 – 0.07	0.254	0.04	-0.01 – 0.11	0.104	0.05	-0.01 – 0.11	0.08	0.05	0.01 – 0.11	0.012
N	35			35			33			35		

log prirodni logaritam, β regresijski koeficijent, CI 95 % interval pouzdanosti (*confidence interval*), P P-vrijednost, p paritet, u unipare (referentna skupina=multipare).

5.9. Citokini

Analizirani su podaci za IL-6, IL-1B i TNF. Za ostale citokine, razine veće od LLOQ zabilježene su tek sporadično, u rijetkim i pojedinačnim uzorcima, isključujući mogućnost statističke analize.

U mlijeku majki zdrave djece, mjerljive razine ($>$ LLOQ) IL-1B i IL-6 zabilježene su u 1/3 do 1/2 uzoraka, bez značajne evolucije u kontrolnom intervalu. Među majkama oboljele djece, razdioba i evolucija mjerenih vrijednosti IL-6 u mlijeku povezana je s upalnim biljezima dojenčeta.

U akutnoj fazi bolesti, učestalost IL-1B⁺ i IL-6⁺ uzoraka mlijeka značajno je niža među oboljelima nego zdravim kontrolama (Tablica 1), a mjerljive razine izmjerene su u 1/30 (IL-1B) do 1/5 (IL-6) svih uzoraka mlijeka majki oboljele djece (Slika 5.12). Pri tom, suprimiran IL-6 je povezan sa značajno višim serumskim CRP oboljelog djeteta [3.4 (0.5-25.3) vs. 0.35 (0.18-1.93) mg/L, $n=23$ vs. 6, IL-6⁻ vs. IL-6⁺, $P=0.031$].

U kontrolnom intervalu, frekvencija IL-1B⁺ i IL-6⁺ uzoraka raste u mlijeku majki oboljele djece i u oporavku je ponovno podjednaka ili slična kontrolnim uzorcima (Slika 5.12, Slika 5.13, Tablica 5.8). Porast IL-6 u oporavku poglavito je vidljiv u mlađih majki [Slika 5.14, 33 (32-36) vs. 31.5 (29.3-32) g., $n=17$ vs. 12, IL-6⁻ vs. IL-6⁺, $P=0.0031$] i majki djece s blagom leukocitozom ili urednim leukocitima [10.5 (7.7-12.7) vs. 7.7 (5.8-10.2) $\times 10^9/L$, $n=17$ vs. 12, IL-6⁻ vs. IL-6⁺, $P=0.027$], kao i u majki s višim IgG4 akutne faze [7.8 (6.3-10.1) vs. 3.9 (3-5.8) ng/L, $n=11$ vs. 12, IL-6⁺ vs. IL-6⁻, $P=0.0074$]. Istodobno, majke s mjerljivim IL-6 također pokazuju više razine mliječnog IgE [Slika 5.15, 19.1 (13.5-21.9) vs. 12.2 (10.3-16) pg/L, $n=12$ vs. 12, IL-6⁺ vs. IL-6⁻, $P=0.028$] i IgG2 u konvalescenciji [260 (181.2-310) vs. 173.6 (125.3-204.5) ng/L, $n=12$ vs. 12, IL-6⁺ vs. IL-6⁻, $P=0.014$]. Naprotiv, u starijih majki (Slika 5.16 i majki oboljele djece s izraženijom leukocitozom nema oporavka IL-6 u kontrolnom intervalu, a suprimiran IL-6 češće perzistira tijekom konvalescentne faze, uz niži mliječni IgE i IgG2 (Slika 5.16).

Za IL-1B, globalna dinamika u mlijeku majki oboljele djece slična je IL-6: akutna faza obilježena je gotovo nemjerljivim vrijednostima (Tablica 5.8), s reverzijom prema kontrolnim frakcijama u oporavku (Slika 5.13). Sličnost dinamike IL-6 i IL-1B ne počiva međutim na

identičnim uzorcima: broj podudarnih, IL6⁺IL-1B⁺ uzoraka vrlo je skroman, i simultana pozitivizacija u oporavku nije česta pojava (4/29 uzoraka).

Suprotno IL-6, majke s mjerljivim IL-1B u oporavku pokazuju značajno niže razine mliječnog IgE [11.1 (9.6-14.6) vs. 16.5 (12.4-21.4) pg/L, n= 6 vs. 18, IL-1B⁺ vs. IL-1B⁻, P=0.036]. U dodatnoj razlici prema IL-6, jasni prediktori individualne dinamike IL-1B nisu identificirani među analiziranim obilježjima.

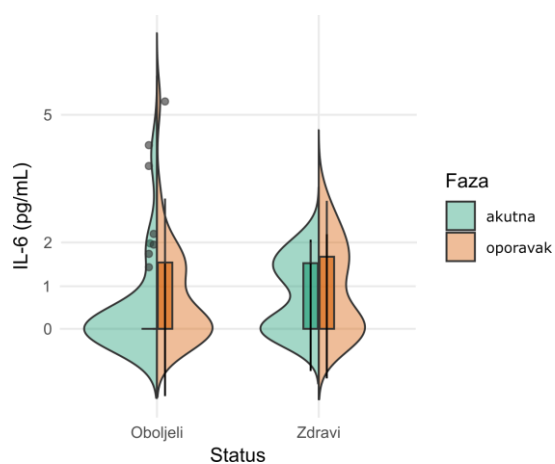
Za TNF, dinamika u mlijeku majki oboljele djece također je slična IL-1B i IL-6. Suprotno zdravim kontrolama, akutna faza bolesti obilježena je sporadično mjerljivim vrijednostima TNF (Tablica 5.8). U kontrolnom intervalu i fazi oporavka, vidljiva je reverzija prema kontrolnoj razdiobi. Pri tom, oporavak TNF u konvalescenciji povezan je sa značajno kraćom laktacijom [4 (3-6) vs. 7 (5-10) mj., n= 7 vs. 22, TNF⁺ vs. TNF⁻, P=0.026], dok je perzistentna supresija TNF značajno češća u kasnoj laktaciji (Tablica 5.9). Nisu zabilježene poveznice s imunoglobulinima.

Tablica 5.8. Dihotomizirana mjerenja izabranih citokina u mlijeku majke oboljele djece.

Citokin	Faza	Status čeda	<LLOQ	>LLOQ	Fisher exact P
IL-6	akutna faza	zdravi	8	8	0.053
		oboljeli	23	6	
	oporavak	zdravi	8	8	0.76
		oboljeli	17	12	
IL-1B	akutna faza	zdravi	10	6	0.0054
		oboljeli	28	1	
	oporavak	zdravi	12	4	0.726
		oboljeli	23	6	
TNF	akutna faza	zdravi	9	7	0.021
		oboljeli	26	3	
	oporavak	zdravi	10	6	0.494
		oboljeli	22	7	

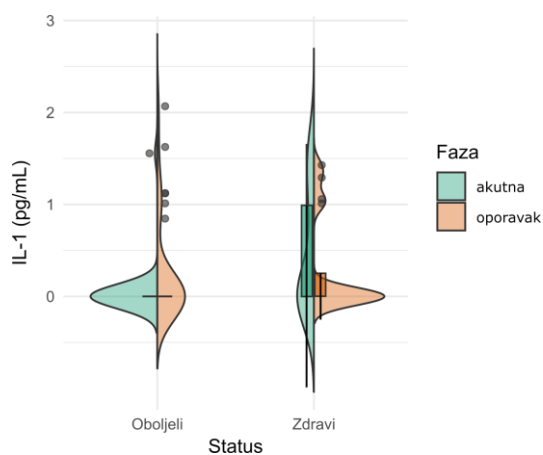
Tablica 5.9. Dihotomizirana mjerenja TNF u mlijeku majke oboljele djece, faza oporavka, podjela prema duljini laktacije.

TNF	<LLOQ	>LLOQ	Fisher exact P
<5 mj.	4	5	0.016
≥5 mj.	18	2	



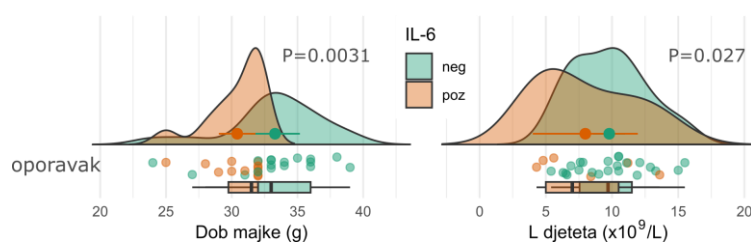
Slika 5.12. Distribucija mjerenja IL-6 u mlijeku majki prema statusu i fazi bolesti.

Ordinata je prirodna log-os ($1 + \text{IL-6/pg/mL}$).



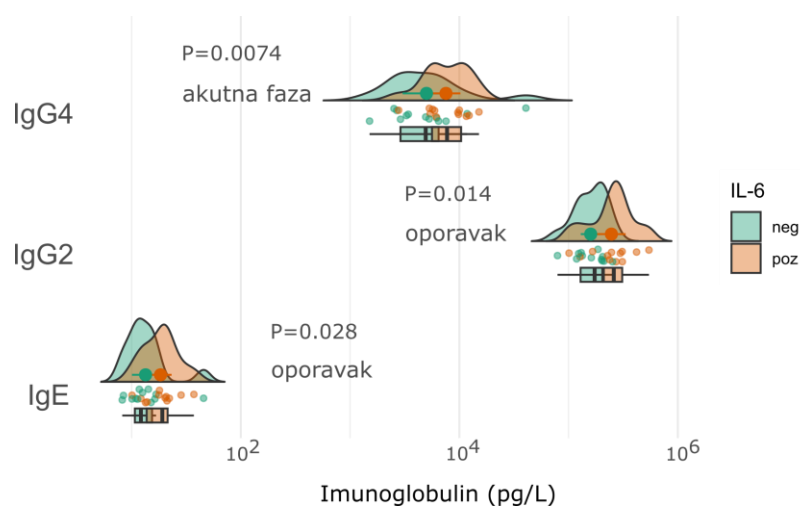
Slika 5.13. Distribucija mjerenja IL-1 u mlijeku majki prema statusu i fazi bolesti.

Ordinata je prirodna log-os ($1 + \text{IL-1/pg/mL}$).



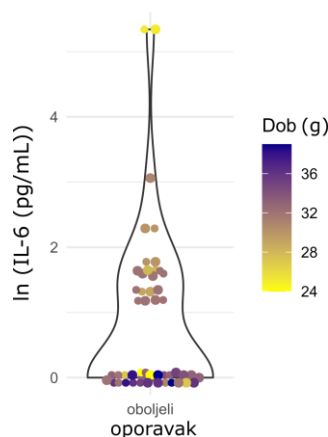
Slika 5.14. Dob majke i leukociti oboljelog djeteta za dihotomizirane vrijednosti IL-6 mjerene u oporavku.

P- vrijednosti odgovaraju Mann-Whitney testu, a kutijasti dijagrami Tukey konvenciji. Svaka točka odgovara jednom uzorku. Boja točke kodira pripadnost skupini.



Slika 5.15. Distribucija izabranih imunoglobulina u mlijeku majki za dihotomizirane vrijednosti IL-6 mjerene u oporavku.

P - vrijednosti odgovaraju Mann-Whitney testu, a kutijasti dijagrami Tukey konvenciji. Svaka točka odgovara jednom uzorku. Apscisa je dekadski log-os. Boja točke kodira pripadnost skupini.



Slika 5.16. Gustoća opažanja za IL-6 u mlijeku majki, konvalescentna faza.

Svaka točka odgovara jednom uzorku, a boja točke kodira dob majke (tamnija nijansa-viša dob). Ordinata je prirodna log-os ($1 + \text{IL-6/pg/L}$).

6. Rasprava

Poznato je da se novorođenčad rađaju s imunološkim sustavom koji je nezreo i u tim prvim danima i mjesecima svoga života njihova zaštita oslanja se na prijenos imuniteta s majke. Majka svoja protutijela prenosi u trudnoći putem placente, a poslije poroda putem majčinog mlijeka (163). Dojenčad pak u stjenci crijeva prolazno posjeduje specifične neonatalne receptore za Fc fragment imunoglobulina (od engl. fragment crystallizable (Fc) region of IgG; FcRn), koji omogućava absorpciju intaktnih imunoglobulina iz probave u cirkulaciju (163). Sastav zrelog mlijeka tijekom prve godine dojenja razlikuje se od sastava kolostruma i ima viši udio ugljikohidrata i lipida, a smanjen udio proteina, i niže razine protutijela (164).

Majčino mlijeko sadrži mnoge obrambene čimbenike prvenstveno velike količine sekretornih IgA protutijela koje proizvode B limfociti koji su migrirali iz majčinih crijeva u mliječne žlijezde. Obrambeni učinci majčinog mlijeka sprečavaju pojavu infekcije u dojenčeta već na razini sluznice (165).

Majčino mlijeko je promjenjiva tekućina te se koncentracije pojedinih Ig mijenjaju tijekom intervala dojenja (106). Sukladno tome različit je profil Ig u svakoj fazi dojenja: u kolostrumu, prijelaznom mlijeku i zrelom mlijeku. U ovom istraživanju proučavani su imunoglobulini u zrelom mlijeku, a dodatno smo istraživali prilagodbu staničnog, imunoglobulinskog i citokinskog sastava potrebama zaštite dojenčeta tijekom akutne infekcije, što je pokazano i u nekim od prethodnih studija (25,79).

6.1. Stanični sastav majčinog mlijeka te njegove promjene tijekom akutne infekcije djeteta

Majčino mlijeko je bogato imunološkim stanicama: monocitima/makrofazima, neutrofilima, pomoćničkim, citotoksičnim i regularnim T limfocitima, NK stanicama i B limfocitima. Ove stanice imaju sposobnost proizvodnje bioaktivnih molekula – laktoferina, lizozima, oligosaharida i citokina i na taj način pružaju dojenčetu aktivan imunitet. B limfociti pomažu proizvodnjom Ig. Istraživanja su pokazala da se u svakom mililitru majčinog mlijeka koje je proizvedeno tijekom prvih nekoliko dana nakon poroda nalazi oko 3 milijuna leukocita. Makrofagi su dominantni leukociti u ljudskom kolostrumu (40-50% ukupnih leukocita), zatim

slijede polimorfonuklearni neutrofili (40-50% ukupnih leukocita) i limfociti (5-10% ukupnih leukocita) (25,34). Studije rađene na majčinu mlijeku su dokazale prisutnost različitih populacija limfocita T u čija se zastupljenost razlikuje u usporedbi s perifernom cirkulacijom (25,128,166). Naime, identificirani su povećani udjeli efektorskih i memorijskih T-stanica u majčinom mlijeku u usporedbi s perifernom krvlju (167,168).

Riskin i sur. su u svojoj studiji istražili mijenjaju li se imunološki čimbenici u majčinom mlijeku tijekom infekcije dojenčadi. Uzorkovali su majčino mlijeko majki 31 dojenčeta, do 3 mjeseca starosti, koje su hospitalizirane s povišenom tjelesnom temperaturom, tijekom aktivne bolesti i oporavka. Kao kontrola poslužilo je mlijeko majki 20 zdravih dojenčadi. Utvrdili su da tijekom aktivne infekcije u dojenčadi, ukupan broj bijelih krvnih stanica, posebno broj makrofaga, i razina $\text{TNF}\alpha$ raste u majčinom mlijeku (79). Isto istraživanje je pokazalo da razine interleukina-10 u majčinom mlijeku bolesne dojenčadi snižavaju nakon oporavka, međutim isti trendovi su zamjećeni u zdravih kontrola. Zanimljiv je nalaz ove studije da se razine sekretornog IgA nisu značajno promijenile ni u ispitivanoj ni u kontrolnoj skupini (79).

U našem istraživanju dominantno obilježje staničnih frekvencija u majčinom mlijeku bila je njihova visoka varijabilnost, bez uvjerljive evolucije staničnih profila tijekom laktacije, zbog toga su citometrijski podaci za oboljele bili skupno analizirani. CD4^+ stanice bile su brojnije od CD8^+ stanica u T populaciji, u obje faze bez značajne razlike među oboljelima i zdravima. Wirt i sur. u svom istraživanju su pokazali da je u majčinom mlijeku srednji omjer $\text{CD4}/\text{CD8}$ T stanica bio 0,88, u rasponu od 0,40 do 1,25. Taj omjer u njihovom istraživanju je bio značajno smanjen u usporedbi s perifernom krvi kontrolnih odraslih osoba i žena nakon poroda (128).

Ova studija je pokazala značajan pad $\text{V}\delta 2^+/\text{V}\delta 1^+$ omjera u parnim mjeranjima u mlijeku majki oboljele dojenčadi tijekom faze oporavka. Studija koju su proveli Bedin i sur. na ranom prijelaznom mlijeku HIV-om zaraženih žena u odnosu na mlijeko nezaraženih i u usporedbi s perifernom krvi izvijestila je o kompartmentalizaciji $\gamma\delta$ T limfocita u mlijeku. Medijan učestalosti $\gamma\delta$ T limfocita bio je 8,95% među CD45^+ stanicama majčinog mlijeka u usporedbi s 2,54% u krvi u nezaraženih žena HIV-om i 7,26% u majčinom mlijeku naspram 3,31% u krvi žena zaraženih HIV-om (169). U našoj studiji, udjeli $\gamma\delta$ T limfocita su bili niski, a vrlo vjerojatan uzrok je u tome što je većina mlijeka u našoj studiji potjecala od majki koje su

svoje djetete dojile duže vrijeme, odnosno radilo se o zrelom mlijeku koje sadži značajno manju staničnu frakciju, usporedno sa sve bolje razvijenim imunološkim sutavom dojenčeta.

Nadalje, ova studija je pokazala da mlijeko majki oboljele djece u akutnoj fazi ima značajno manje CD8⁺ citotoksičnih T limfocita u odnosu na mlijeko majki zdrave djece. U oporavku, udio CD8⁺ T stanica značajno raste približavajući se ponovno kontrolnim proporcijama. Istodobno, ovaj porast udjela CD8⁺ T stanica tijekom oporavka praćen je zrcalnim padom udjela CD4⁺ T stanica. U fazi oporavka, vidljivi su također relativno niži udjeli CD3⁺limfocita i NKT stanica za oboljelu djecu u usporedbi s kontrolama u istom intervalu, no bez značajnog hoda frekvencija između akutne i konvalescentne faze oboljelih.

Ying Jin i sur. u svom istraživanju koje su proveli na kolostrumu kineskih majki pokazali su da je postotak NK stanica u ukupnim CD4(+)CD45RO(+) T stanicama kolostruma atopičnih majki bili značajno niži u odnosu na majke bez atopije. Isto tako apsolutni broj CD4(+) T limfocita i njihova ekspresija CD40L bili su značajno manji u majčinom mlijeku majki koje su rodile carskim rezom u odnosu na one koje su imale prirodni porod (170). Rezultati tog istraživanja sugeriraju povezanost atopije i vrste poroda s fenotipovima limfocita u kolostrumu.

U našem istraživanju također smo uočili povezanost kliničkih parametara i imunoglobulinskog sastava sa staničnim sastavom mlijeka. Naime, u fazi oporavka razina IgG2 i IgM u mlijeku pozitivno je korelirala s frekvencijama CD4⁺ T stanica. Razina IgM u oporavku dodatno je povezana s udjelom T stanica i B stanica. U oboljelih, faza oporavka obilježena je značajnim padom Vδ2⁺/Vδ1⁺ omjera u parnim mjerenjima. Viši CRP djeteta povezan je s višim udjelom γδT stanica u mlijeku tijekom akutne faze bolesti, a u oporavku zapažen je pad frekvencije CD3⁺Vδ2⁺stanica u djece s višim leukocitima. U obje faze, razina IgA povezana je pozitivno s udjelom i brojnošću Vδ2⁺ stanica u mlijeku: kako u akutnoj fazi bolesti, tako i u oporavku. Za ostale Ig klase, zastupljenost različitih vrsta γδT stanica u mlijeku uglavnom inverzno zrcali Ig koncentracije.

6.2. Distribucija imunoglobulina u humanom mlijeku

Komponente majčinog mlijeka utječu na razvoj imuniteta djeteta. Od svih komponenti najviše su proučavani imunoglobulini. Protutijela u majčinom mlijeku sastoje se od ~80% ukupnog IgA (~73% SigA/27% IgA), oko 15% ukupnog IgM i oko 5% IgG (101). U prva tri mjeseca

života cirkulirajući imunoglobulini dojenčeta su predominantno majčinog podrijetla, stečeni uglavnom transplacentarnim putem tijekom trudnoće. Za razliku od placentarno prenesenih Ig koji direktno ulaze u sistemsku cirkulaciju fetusa i posreduju ključne zaštitne učinke u obrani od brojnih infekcija tijekom djetinjstva, imunoglobulini iz majčinog mlijeka se, radi zatvaranja mukozne barijere pri rođenju, zadržavaju na sluzničnim površinama novorođenčeta gdje čine prvu liniju obrane od komezalnih, crijevnih i respiratornih patogena kojima je bila izložena majka. Takve „iskusne“ varijante imunoglobulina osiguravaju zaštitu novorođenčadi od neonatalnih infekcija, te upravljaju razvojem sluzničnog mikrobioma, i tolerancije prema mukoznim antigenima.

Imunoglobulin A je glavni imunoglobulin u ljudskom kolostrumu i mlijeku no prisutan je i u mlijeku većine drugih vrsta sisavaca (171). Majčino mlijeko je jedini izvor sIgA tijekom prvog mjeseca života zbog nedostatka funkcionalnih plazma stanica u dojenčeta (172). Luče ga plazma stanice koje se razvijaju u limfnom tkivu pridruženom sluznicama i probavnom traktu majke, a poslije nastanjuju mliječne žlijezde i luče imunoglobuline koje dojenče dobiva putem majčinog mlijeka (173). Udio IgA veći je u kolostrumu nego u prijelaznom i zrelom mlijeku, u kojima udio IgA opada s porastom udjela drugih imunoglobulinskih frakcija (174). Sukladno navedenom, u usporedbi sa zrelim mlijekom, značajno veći udjeli SARS-CoV-2-specifičnih IgA protutijela izmjereni su u kolostrumu majki s potvrđenom infekcijom SARS-CoV-2 tijekom trudnoće ili poroda. Mliječni sIgA također modulira interakcije između crijevnog mikrobioma i crijeвне sluznice dojenčeta te je neophodan za prevenciju razvoja nekrotizirajućeg enterokolitisa (175).

Majčino mlijeko sadrži i sekretorni IgM (sIgM), IgM i IgG protutijela. Imunoglobulini koji se u manjoj količini prenose intrauterino ili putem kolostruma uglavnom su klase IgG (176). Komponente IgG razreda porijeklom iz majčinog mlijeka prepoznaju patogene bakterije, i sudjeluju u njihovom uklanjanju kroz koordiniranu aktivnost komplementa i Fc-posredovane fagocitoze od strane makrofaga i neutrofila. Istovremeno, sekretorne IgA varijante neutraliziraju bakterijske toksine i posreduju aglutinaciju štetnih mikroorganizama koja onemogućuje njihovu interakciju sa stijenkom probavnog trakta (tzv. imunološko isključivanje), radi čega mikroorganizmi ostaju zarobljeni u lumenu crijeva te se peristaltičkim aktivnostima izbacuju iz probavnog trakta (177).

U ovoj studiji, Ig klase bitno su se razlikovale svojom zastupljenošću i tipičnim masenim koncentracijama, koje su varirale preko 4 reda veličine. IgE je bio najoskudnije zastupljen, a

slijede ga - u rastućem nizu - IgG4 i IgG3. Tipično za sekretorne produkte, IgA je bio snažno zastupljen, a najviše masene koncentracije zabilježene su pak za IgG2, IgG1 i IgM. Istovjetan redoslijed zastupljenosti bio je primijećen u obje skupine majki, neovisno o statusu dojenčeta $IgE < IgG4 < IgG3 < IgA < IgM < IgG1 < IgG2$. U kontrast našim rezultatima, većina dosadašnjih studija opisuje IgA kao najzastupljenije majčino protutijelo koje se nalazi u ljudskom mlijeku s 80-90% udjela u ukupnom Ig (178,179), a slijede ga IgM, IgG i na kraju IgE (178,180–184). Podatci o razinama IgE u majčinom mlijeku su oskudni te je prva studija koja prikazuje koncentracije IgE u prijelaznom mlijeku objavljena 2023. godine (185).

U skladu s prethodno navedenim, u istraživanju ljudskog kolostruma na 105 majki IgA je bio dominantan imunoglobulin, a slijedio ga je IgG i IgM. U istoj studiji istražen je utjecaj stanja uhranjenosti majke, dobi, pariteta i razine prihoda na imunološke čimbenike kolostruma, a rezultati upućuju na to da karakteristike majke nemaju značajnog utjecaja na sadržaj imunoglobulina (179). Nadalje, studija na 22 majke koje su rodile ekstremnu nedonoščad, a u kojoj su ispitivane razlike kolostruma i zrelog mlijeka, pokazala je da su koncentracije većine imunoglobulina bile više u kolostrumu nego u zrelom mlijeku, a razlike su bile značajne za imunoglobulin G3 i imunoglobulin G4 (180).

Predmetom našeg istraživanja bili su nasuprot tome, uzorci zrelog mlijeka, koji s vremenom podliježu značajnim promjenama u staničnom i imunoglobulinskom sastavu. Sukladno navedenom, nedavna studija provedena u uzorcima prijelaznog mlijeka (7-15 dana od poroda) 75 roditelja, bilježi značajan porast IgE i IgG1, IgG2, IgG3 te IgG4 udjela na uštrb smanjenja IgM i IgA (185).

Prvu kvantifikacijsku studiju IgG u majčinom mlijeku kod ljudi objavili su 1977. godine Reddy i sur. u indijskim dobro uhranjenim i pothranjenim ženama. Njihova studija potvrdila je visoku koncentraciju IgA u kolostrumu, koja je brzo padala tijekom prva 4 tjedna laktacije, dok je koncentracija IgG bila je malo viša u kolostrumu nego u zrelom mlijeku. Također nisu pronašli razlike koncentracije imunoglobulina između dobro uhranjenih i nedovoljno uhranjenih majki (186).

Studija Keller i sur. koja je rađena na 27 uzoraka kolostruma i 27 uzoraka plazme pokazala je u 6 uzoraka čvrste dokaze o lokalnoj proizvodnji protutijela specifičnih za IgG4 u mlijeku (182). Nadalje u jednom od pivotalnih istraživanju na majčinom mlijeku iz 1989. godine u kojem su određivane podklase IgG u ljudskom kolostrumu i mlijeku utvrđeno je da je postotak IgG1 bio je značajno povećan, a onaj IgG2 smanjen i u kolostrumu i u mlijeku u

odnosu na udjele zabilježene u serumu zdrave odrasle majke. Postoci IgG3 i IgG4 u kolostrumu, mlijeku i serumu bili su približno isti. Sve koncentracije podklase IgG smanjile su se za 90% tijekom prvog tjedna laktacije i ostale su nepromijenjene (187).

Sukladno rezultatima naše studije, Wright i sur. dokazali su niske koncentracije IgE u majčinom mlijeku. Razine IgE u krvi djece čini se ovisiti o koncentraciji IgE kod majke (188), pri čemu se placentarni transfer IgE protutijela povezuje sa razvojem neonatalnog alergijskog odgovora (189). Analiza razina IgG i IgE specifičnih za alergen u plazmi i u majčinom mlijeku pokazala je da se protutijela IgG i IgE specifična za alergen prenose iz krvi u majčino mlijeko te da IgE u majčinom mlijeku odražava profil reaktivnosti IgE u krvi majke (190).

Studija koja je procjenjivala IgE u kolostrumu atopičnih i neatopičnih majki utvrdila je da od ukupnog sadržaja IgE u majčinom mlijeku, 5-12% je preneseno unutarstanično te da su ukupne razine IgE antitijela bile slične u supernatantima mlijeka i stanicama seruma atopičnih i neatopičnih majki. Taj nalaz nam govori u prilog tome da se IgE antitijela pasivno transportiraju iz krvi u majčino mlijeko (184).

U istraživanju koje su ove godine proveli Fernandez-Buhigas i sur. na uzorcima majki koje su imale potvrđenu infekciju SARS-CoV-2 tijekom trudnoće ili poroda utvrđena je prisutnost specifičnog IgG u zrelom mlijeku u 2/62 (3,23%), specifičnog IgA u 17/62 (27,42%), dok je IgM bio pozitivan u 0/51 slučaja (191), što potvrđuje da majčino mlijeko ima sposobnost selektivne zaštite novorođenčeta prenoseći protutijela sposobna pružiti barijeru protiv istih antigena koji se nalaze u majčinom neposrednom okruženju, a s kojima će se najvjerojatnije susresti i novorođenče.

Opisana istraživanja podupiru pozitivne korelacijske obrasce zabilježene u okviru naše studije između koncentracije IgM i IgE, odnosno IgE i podrazreda IgG2, i u manjem opsegu IgG1. Opisani obrasci povezanosti bili su vidljivi u obje vremenske točke, u zdravih i oboljelih ispitanica, kako u akutnoj fazi bolesti dojenčeta, tako i u konvalescentnoj fazi, ukazujući na utjecaj zajedničkih okolišnih i bioloških čimbenika u organizaciji sastava mliječnih imunoglobulina.

U tom kontekstu, primjećen je značajan učinak dobi ispitanica na oblikovanje Ig profila mlijeka, pri čemu status novorođenčeta u ukupnoj varijanci Ig profila doprinosi sa manje od 10%. Dosadašnje studije zabilježile su povećanu koncentraciju IgG protutijela u mlijeku majki koje isključivo doje u usporedbi s onima koje dojenje kombiniraju s dohranom (106).

Zanimljivi su i literalni podatci koji upućuju na povezanost vrste poroda i sastava imunoglobulina u mlijeku. Primjerice istraživanje koje je proveo Striker i sur. pokazalo je da su prvorotkinje imale više koncentracije IgA i IgM u majčinom kolostrumu od višerotkinja. Skupina koja je rađala carskim rezom imala je veće koncentracije IgA u majčinom kolostrumu od skupine normalnih poroda, dok koncentracije IgM i IgG u kolostrumu nisu bile pod utjecajem vrste poroda (192). U našem istraživanju sastav imunoglobulina u majčinom mlijeku međutim, nije značajno varirao u ovisnosti o broju ili vrsti poroda

6.3. Promjene sastava imunoglobulina majčinog mlijeka tijekom akutne infekcije dojenčeta

Mlijeko majki s oboljelom dojenčadi bilo je obilježeno povišenom razinom ukupnog Ig kako u akutnoj, tako i u konvalescentnoj fazi, i to prvenstveno na račun asimetričnog porasta pojedinih klasa Ig. Koncentracija IgE, IgG1, IgG2 i IgG4 bila je pri tome značajno viša u mlijeku majki čije je dojenče u akutnom infektu u usporedbi s mlijekom majki zdrave djece. Ova je razlika zadržana i u konvalescenciji, barem do kraja prvog mjeseca nakon infekta, što ukazuje da je mjereni kontrolni interval najvjerojatnije nedovoljan za opažanje „normalizacije” razine imunoglobulina do referentnih vrijednosti. Koncentracije IgA i IgM bile su, nasuprot tome, slične u obje skupine majki duž cijelog trajanja istraživanja, osim u ranoj dojenačkoj dobi oboljele djece, kada je zabilježen značajan pad koncentracije IgM u kontrolnom intervalu između akutne i konvalescentne faze.

Povećanje razine HIV-specifičnih IgG na uštrb IgA i IgM imunoglobulina ranije je zabilježeno u majčinom mlijeku HIV-pozitivne dojenčadi koje su dojile njihove HIV-inficirane majke (193). Infekcija SARS-CoV-2 virusom povećava i razine IgA u mlijeku SARS-CoV-2-pozitivnih majki, pri čemu titar anti-SARS-CoV-2 titar perzistira u mlijeku majki i 6 mjeseci nakon infekcije, a u 43% uzoraka IgA titar nastavlja rasti s vremenom. (167). Anti-SARS-CoV-2 IgA protutijela zabilježena su i mlijeku te u usnoj sluznici dojenčadi majki koje su SARS-CoV-2 infekciju preboljele u trudnoći, a koje ostaju seropozitivne i 2 mjeseca nakon poroda (194). Štoviše, neutralizirajuća anti-SARS-CoV-2 IgA protutijela zabilježena su u uzorcima mlijeka SARS-CoV-2 pozitivnih majki, ali ne i u neoboljelih kontrola, pri čemu sposobnost vezanja IgA protutijela za Spike antigen snažno pozitivno korelira sa kapacitetom neutralizacije anti-SARS-CoV-2 IgA protutijela. Fox. i sur. izvijestili su i da je da je svih 28 testiranih žena u njihovoj studiji imalo prisutan IgA u

majčinom mlijeku 4-10 mjeseci nakon infekcije, a 43% njih imalo je čak i više titre od onoga što su imale 1 mjesec nakon infekcije. Ovi rezultati ukazuju na važne i dugoročne učinke sekretornih IgA protutijela iz majčinog mlijeka u zaštiti dojenčadi od virusnih infekcija (167). Pasivni imunitet koji dojenjem osigurava zaražena majka rezultat je sazrijevanja plazma stanica u limfoidnom tkivu povezanom s crijevima, putem entero-mamarnog veze, ili u drugih sluznica te putem drenaže iz lokalnih limfnih žila sistemskog sustava, nakon čega aktivirane plazma stanice naseljavaju mliječnu žlijezdu i luče antigen-specifične imunoglobuline koji se prenose u mlijeko (168). Pullen i sur. otkrili su IgG u niskoj razini, ali nisu zamijetili promjenu u titrima tijekom vremena (srednje vrijeme prikupljanja uzoraka je bilo 66 dana). Oni su utvrdili i da IgG funkcionalno oslabljen u usporedbi s IgA i IgM (195). Fox, A. i sur. izvijestili su da su otkrili anti-S IgG protutijela u 75% sudionika, pri čemu je 13% njih bilo prisutno u visokim titrim. Prisutnost specifičnih imunoglobulina protiv SARS-CoV-2 u majčinom mlijeku zaraženih ili cijepljenih majki mogla bi zaštititi dojenčad od budućih infekcija ili čak od teških oblika bolesti (167).

Izravna usporedba Ig profila mlijeka majki s oboljelom i zdravom djecom bila je međutim, otežana razlikama u laktacijskoj dobi, paritetu majki, i prehrani između zdrave i oboljele djece. U kontrolnoj skupini dominirale su prvorotke s dojenčadi u ranoj fazi laktacije (<5 mj.) pa je susljedna usporedba Ig profila mlijeka majki s oboljelom i zdravom djecom provedena nakon stratifikacije po laktacijskoj dobi.

U stratificiranoj analizi, razine IgG1 i IgG2 u mlijeku majki dojenčeta u akutnoj fazi bolesti bile su i dalje značajno više u usporedbi s koncentracijama IgG1 i IgG2 u mlijeku majki zdrave djece ujednačenog statusa po dojenačkoj dobi, paritetu, prehrani i izlaganju duhanskom dimu. Povećane razine IgG2, ali ne i IgG1, perzistiraju i u konvalescentnoj fazi, uz slične razine svih preostalih klasa Ig u obje skupine. Za razliku od IgG1 i IgG2, dinamika IgE i IgG4 u mlijeku majki oboljele djece varira s trajanjem laktacije, pri čemu se koncentracije oba imunoglobulina postepeno povećavaju od rane (<5 mj) prema kasnoj laktaciji (5-12 mj.), kada postižu značajno više vrijednosti u usporedbi sa ranim laktacijskim intervalom. Pri tom, oba kulminiraju u oporavku: IgG4 raste dijelom već u akutnoj fazi, dok je porast IgE odgođen i jasnije izražen u oporavku nego akutnoj fazi.

Ranija longituinalna analiza promjena imunoglobulinskog profila humanog mlijeka tijekom produljene laktacije (do 48 mjeseca) utvrdila je da koncentracije sIgA i IgG, ali ne i IgM, pozitivno koreliraju s duljinom laktacije od 1. do 48. mjeseca. Najniže koncentracije sIgA i

IgG zabilježene su u prvoj godini, a najviše nakon 2. godine laktacije. Koncentracija IgM ostala je stabilna tijekom 2 godine, a nakon 24 mjeseca neznajno raste, dok razine sIgA i IgG kulminiraju nakon 2. godine laktacije (196).

Zanimljivo, broj podoja negativno korelira s koncentracijom imunoglobulina u humanom mlijeku (196). Osim broja na razinu imunoglobulina u majčinom mlijeku utječe i vrsta prehrane dojenčeta. Tome u prilog govori analiza razine fekalnog sIgA u prvom mjesecu života dojene djece koje značajno nadmašuju vrijednosti sIgA u fecesu novorođenčadi hranjene adaptiranim mlijekom, ali se te razlike ujednačavaju u dobi od 6 mjeseci (197). Zdravstveno stanje majke također utječe na razine sIgA u ljudskom mlijeku, u prilog čemu svjedoče smanjene razine sIgA zabilježene u zreom mlijeku majki s gestacijskim dijabetesom (102), majki s postporođajnim stresom, anksioznošću i depresijom (198).

Značajne razlike u Ig sastavu mlijeka majki zdrave djece mjerenog prije i nakon kontrolnog intervala, ili u parnoj usporedbi (akutna i konvalescentna faza) Ig sastava mlijeka majki oboljele djece (nestratificirana analiza) u akutnoj i konvalescentnoj fazi, nisu zabilježene.

Za kasnu laktaciju dob, direktna usporedba Ig profila mlijeka majki zdrave i oboljele dojenčadi preostaje za buduće istraživanje, prvenstveno zbog nedostatka podudarne kontrolne skupine u ovom istraživanju.

6.4. Povezanost imunoglobulinskog profila s demografskim i kliničkim obilježjima majke i djeteta

Ova studija pokazala je da viša koncentracija IgM u mlijeku majke povezana je s nižom koncentracijom CRP-a u serumu djeteta. Isti rezultat mjerenja perzistira u obje vremenske točke. Također viša koncentracija IgM i IgA u mlijeku majke povezana je sa značajno nižim brojem leukocita u krvi djeteta u akutnoj fazi, a relacija između leukocita djeteta i IgM perzistira marginalno i u konvalescenciji. Pokazalo se da starije majke oboljele djece imaju niži IgM u mlijeku, i ta je dobna razlika vidljiva u infektu i u oporavku dojenčeta.

U ovoj studiji u majki koje su pušile pronađen je konzistentno niži IgG2 u akutnoj i konvalescentnoj fazi slično kao i u drugoj studiji gdje su koncentracije IgG u serumu bile su niže u pušača nego u nepušača, ali serumske razine IgA i IgM u pušača nisu se značajno razlikovale od onih u nepušača (199). U našoj studiji kod zdravih majki je primijećeno da

koncentracija IgG2 i IgG3 raste s višom dobi majke kao i da koncentracija IgG4 opada s laktacijskom dobi tj. da je dulje dojenje povezano s nižom razinom IgG4 u mlijeku. Primijećeno je i da visoka temperatura kod djeteta je utjecala na razinu IgG3, te je on kod majki s afebrilnim djetetom bio viši u odnosu na mlijeko majki s oboljelom, ali febrilnim dojenčecom. Drugi autori su dokazali povezanost indeksa tjelesne mase i pariteta s razinom IgG protutijela i utvrdili su da su razine IgG ljudskom mlijeku bile niže u majki s visokim ITM, odnosno višim paritetom (100).

Studija na 38 žena koja je istraživala koncentraciju IgA, IgM i IgG u kolostrumu, prijelaznom i zreom mlijeku te utjecaj pariteta, dobi, ITM i obiteljskog prihoda na sadržaj izlučenih imunoglobulina u humanom mlijeku pokazala je da je IgA najzastupljeniji imunoglobulin u sve tri vrste mlijeka. Koncentracija IgA i IgM pokazala je nagli pad s odmicanjem vremena dok je nasuprot tome razina IgG pokazala porast koncentracije. Analiziran je i učinak karakteristika majke (dob, paritet i ITM) i prihoda obitelji na razine IgA, IgM i IgG u različitim fazama laktacije. Dob majke nije značajno utjecala na razinu imunoglobulina kolostruma, prijelaznog i zreog mlijeka, ali je paritet pokazao statistički značajan utjecaj na razinu IgG i IgM u prijelaznom mlijeku. Razina IgG prijelaznog mlijeka i zreog mlijeka smanjivala se s povećanjem pariteta. Prvorotkinje su imale višu koncentraciju IgA u kolostrumu od višerotkinja. Dojilje koje su imale ITM <18,5 imale su niži IgA u kolostrumu nego one s višim i normalnim ITM. Sličan nalaz primijećen je i u slučaju obiteljskog dohotka (200).

6.5. Promjene citokinskog sastava majčinog mlijeka tijekom akutne infekcije dojenčeta

Citokini se nalaze u majčinom mlijeku te su neizostavni za zdrav razvoj imunološkog sustava novorođenog djeteta. Za novorođenčad koja općenito imaju manjak ovih proteina majčino mlijeko je glavni izvor citokina, posebno onih protuupalnih. Do sada su u majčinom mlijeku identificirani proupalni citokini TNF α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-2 i INF γ , kao i protuupalni citokini uključujući transformirajući faktor rasta (TGF) β , IL-7, IL-10, IL-18 i G-CSF (182). Istraživanja upućuju na važnost kako protuupalnih citokina (IL-10, TGF- β) tako i proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF) koji se nalaze u majčinom mlijeku u zaštiti novorođenčeta od patogena i regulaciji imunološkog odgovora (83).

U mlijeku majki s atopijskim bolestima uočena je veća koncentracija citokina koje proizvode Th2 limfociti (IL-4, IL-13, IL-5, IL-10) i niže razne TGF- β (201,202). Podrijetlo citokina u majčinom mlijeku još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno te se kao jedan od potencijalnih izvora smatraju i epitelne stanice dojke. Osim toga, leukociti (neutrofili, monociti/makrofagi, limfociti) putem limfnih žila i sistemske cirkulacije migriraju u majčine dojke. Oni djeluju na razvoj imunološkog sustava djeteta i izravno djeluju na patogene (25). Leukociti to ostvaruju putem fagocitoze, izlučivanja antimikrobnih čimbenika kao što su citokini i imunoglobulini (184,185) i to ne samo u GI traktu nego i u udaljenim tkivima gdje se leukociti prenose putem sistemske cirkulacije. Već u uvodu je rečeno da su leukociti u majčinom mlijeku aktivirani, pokretni i interaktivni (25,128).

Najveće količine IL-6 i TNF- α nalazi se u kolostrumu zbog promjena u ženinom tijelu tijekom trudnoće i poroda. Njihova količina je veća na početku laktacije nego u zreom mlijeku zbog promjena koje se događaju u tijelu žene tijekom trudnoće i poroda. To je u skladu s našim rezultatima niskih razina i niske zatupljenosti citokina općenito u zreom majčinom mlijeku, a da pri tome nije prisutna upala mliječnih žlijezda u vidu mastitisa. S druge strane, istraživanja su pokazala da kod komplikacija u trudnoći kao što je preeklampsije, visoke razine citokina u majčinom mlijeku mogu postojati i do 30 dana nakon poroda (203). U alergičnih majki može se uočiti veća koncentracija citokina koje proizvode limfociti Th2 i to IL-4, IL-13, IL-5, IL-10 te niži niži TGF- β (201). Tijekom faze laktacije mijenja se sastav citokina, ali isto tako na sastav citokina može utjecati zdravlje majke (stres, alergije, prehrana) i komplikacije tijekom trudnoće (68,204–206). Depresija, stres ili posttraumatska bol također mogu pridonijeti povećanim razinama proupalnih citokina (207).

Veće koncentracije IL -6 u mlijeku opažene su kod majki koje su imale mastitis u odnosu na mlijeko zdravih majki. Razlika je bila veća kod majki koje su uz mastitis imale i sistemske simptome bolesti (povišena temperatura, slabost). Promjene su se smanjivale tijekom liječenja i zbog toga je od velike važnosti na vrijeme započeti odgovarajuće liječenje (208). U novorođenčadi je povećana razina IL-1 β povezana s neonatalnom žuticom (209). Izloženost zagađivačima također disregulira ravnotežu citokina humanog mlijeka prema proupalnom profilu i može potencijalno doprinijeti razvoju imunoloških poremećaja kasnije u životu (68).

Prehrana je važan modulator upale, a pokazalo se da prehrambeni obrazac majke regulira imunološke komponente humanog mlijeka (210), a nekvalitetna prehrana utječe na razine proupalnih citokina u humanom mlijeku (211).

U studiji Coussons-Read i sur. koji su proveli na 30 trudnica otkrili su da trudnice koje su pod stresom pokazuju povećane razine proupalni citokina IL-6, IL-8 i TNF- α , a sadržaj protuupalnog citokina IL-10 je znatno niži u usporedbi s trudnicama koje nisu bile pod stresom (212). Oni su u svom istraživanju primjetili da su visoke razine IL-6 i TNF- α povezane s preeklampsijom i prijevremenim trudovima. Budući da se TNF- α oslobađa kao odgovor na virusne i bakterijske infekcije kod trudnica, infekcije tijekom trudnoće mogu povećati rizik od prijevremenog poroda (212).

Majčino mlijeko majki s celijakijom pokazalo je značajno niže razine transformirajućeg faktora rasta (TGF)- β 1 i sIgA te gotovo značajno niže razine interferona (IFN) (206).

U studiji Ramiro-Cortijo i sur. ispitane su promjene citokina majčina mlijeka u prvom mjesecu laktacije kod kohorte španjolskih dojilja. Ispitane su i njihove razlike s obzirom na neonatalne čimbenike (spol, gestacijska dob), čimbenike majke (porodničke komplikacije, carski rez, i prehrana) i njihov odnos s oksidativnim statusom (213). Proučavana su šezdeset tri para majka-novorođenče 7. i 28. dana laktacije. Prehrambene navike procijenjene su 72-satnim praćenjem prehrane te je izračunat upalni indeks prehrane majke (mDII). Glavni identificirani čimbenici koji utječu na citokine majčinog mlijeka bili su razdoblje laktacije, gestacijska dob i prehrana. Tijekom prvog mjeseca laktacije, obrazac citokina evoluirao prema protuupalnom profilu. Dodatno, prijevremeni porod i carski rez mogu imati utjecaj na više raziname proupalnih citokina u majčinom mlijeku. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajan utjecaj prehrane na citokinski sastav mlijeka te njegov potencijal u modulaciji citokinskog sastava. Sve navedeno sugerira relevantnost savjetovanja majki o važnosti pravilne i urvnotežene prehrane, osobito kod žena s prijevremenim porodom ili carskim rezom (213).

Saiti i sur. još su 1991.g. u svom istraživanju utvrdili da se u ljudskoj sirutki nalazi velika količina IL-6. Koncentracija IL-6 u kolostrumu bila je značajno viša od one u zrelom mlijeku i serumu. Utvrdili su da postoji značajna pozitivna korelacija između koncentracije IL-6 i broja mononuklearnih stanica u mlijeku. Stimulacija mononuklearnih stanica humanog mlijeka pomoću *Staphylococcus aureus* Cowan I u prisutnosti anti-IL-6 protutijela značajno je smanjila proizvodnju IgA (214). Taj podatak govori u prilog tome da je IL-6 sadržan u mlijeku usko povezan s lokalnom proizvodnjom IgA u dojkama.

U našem istraživanju učestalost IL-1B⁺ i IL-6⁺ mlijeka tijekom akutne faze bolesti dojenčeta bila je značajno je niža među oboljelima u usporedbi sa zdravim kontrolama, a mjerljive

razine izmjerene su u 1/30 (IL-1B) do 1/5 (IL-6) svih uzoraka mlijeka majki oboljele djece. U kontrolnom intervalu, frekvencija IL-1B⁺ i IL-6⁺ uzoraka raste u mlijeku majki oboljele djece i u oporavku je ponovno podjednaka ili slična kontrolnim uzorcima. U mlijeku majki zdrave djece, mjerljive razine (> LLOQ) IL-1B i IL-6 zabilježene su u 1/3 do 1/2 uzoraka, bez značajne evolucije u kontrolnom intervalu.

Studija je pokazala da je kod oboljele djece, razdioba i evolucija mjerenih vrijednosti IL-6 u mlijeku povezana s upalnim biljezima dojenčeta. Porast IL-6 u oporavku poglavito je vidljiv u mlađih majki i majki djece s blagom leukocitozom ili urednim leukocitima, kao i u majki s višim IgG4 akutne faze. Istodobno, majke s mjerljivim IL-6 također pokazuju više razine mliječnog IgE i IgG2 u konvalescenciji. Naprotiv, u starijih majki i majki oboljele djece s izaženijom leukocitozom nema oporavka IL-6 u kontrolnom intervalu, a suprimiran IL-6 češće perzistira tijekom konvalescentne faze, uz niži mliječni IgE i IgG2.

U istraživanju kojim se ispitivlo utječe li infekcija COVID-19 na citokine povezane s T stanicama određivana je koncentracija IL-2, IL-4, TNF-β, IFN-γ i IL-7. U istraživanju je sudjelovalo 10 majki s pozitivnim PCR testom na COVID-19, 10 majki s simptomima infekcije ali bez pozitivnog testa i 20 majki koje su bile bez simptoma i bez pozitivnog testa. Rezultati ove studije su pokazali da je razina ljudskog IL-2 u humanom mlijeku bila viša u skupini bez infekcije u odnosu sa skupinom koja je imala pozitivan PCR test, ali se nije razlikovala između majki sa i bez znakova infekcije. Razina IL-2 bila je niža kod majki s pozitivnim PCR testom u odnosu na majke sa simptomima bolesti. Razine IL-2, IL-4, IL-17 bile su manje u konvalescenciji. Osime toga, razina TNF-β također je imala tendenciju pada s protokom vremena od infekcije ili pozitivnog testa. U njihovoj studiji postporođajno vrijeme, dob majke i spol djeteta nisu bili u korelaciji s razinama citokina u humanom mlijeku. Razina humanog IL-2 bila je u pozitivnoj korelaciji s IL-17, IL-4 i TNF-β u mlijeku (215).

Bryan i sur. su bili prvi koji su odredili koncentracije IL-2 u vodenoj fazi humanog mlijeka. IL-2 je inače moćni regulator i aktivator T limfocita, a njegov izvor u mlijeku ima važnu ulogu u sazrijevanju imunološkog sustava dojenčeta (216).

Prethodne studije su već pokazale da se komponente humanog mlijeka mijenjaju tijekom infekcije te se broj imunoloških stanica značajno povećava kao odgovor na infekcije majke i djeteta (217). Zheng i sur. su istraživali upalne CD16⁺ i neupalne CD16⁻ makrofage koji se vraćaju u majčino mlijeko kao odgovor na infekcije kod dojenčadi. Prikupili su perifernu krv i zrelo mlijeko od 33 zdrave majke dojenčadi s respiratornim infekcijama te od 26 zdravih

majki zdrave dojenčadi. Imunofenotipizacija stanica majčinog mlijeka protočnom citometrijom pokazala je značajan porast CD16⁺ makrofaga kao i pad frekvencija CD16⁻ makrofaga u majčinom mlijeku iz skupine s bolesnom dojenčadi u usporedbi sa skupinom zdrave dojenčadi. Majčino mlijeko pokazalo je više koncentracije IL-6 i IL-8 nego serum, a infekcija dojenčeta uzrokovala je povećanje ovih citokina samo u mlijeku. Uočene razlike sugeriraju da tijekom infekcije kod dojenčadi dolazi do promjene fenotipa makrofage prema proupalnom profilu, vjerojatno kao bi dodatno zaštitili dojenče (218).

Kod stanovnika u zemljama koje imaju visoku izloženost zarazama, primijećen je manji rizik od imunoloških posredoovanih bolesti (alerije, Chronova bolest). Potomci imigranata koji se useljavaju u razvijene zemlje imaju veći rizik od imunološki posredovanih bolesti od autohtonog stanovništva. Istraživanje koje je provedeno s ciljem ispitivanja utjecaja izloženosti u djetinjstvu i naknadne izloženosti kod majki iz Švedske koje su imigrirale iz zemalja u razvoju pokazalo je značajno više razine IL-6, IL-8 i TGFβ1 u mlijeku tih majki (219). Rezultati njihovog istraživanja govore u prilog tome da zemlja rođenja majke može utjecati na imunološke karakteristike majčinog mlijeka u odrasloj dobi i potencijalno postojanje rizika od bolesti kod potomaka.

U ovoj studiji akutna faza obilježena je gotovo nemjerljivim vrijednostima IL1B u mlijeku majki oboljele djece, s reverzijom prema kontrolnim frakcijama u oporavku. Dinamika TNF u mlijeku majki oboljele djece također je slična IL-1B i IL-6. U kontrolnom intervalu i fazi oporavka, vidljiva je reverzija prema kontrolnoj razdiobi. Pri tom, oporavak TNF u konvalescenciji povezan je sa značajno kraćom laktacijom, dok je perzistentna supresija TNF značajno češća u kasnoj laktaciji.

U istraživanju Gadzala - Kopciuch i sur. u kojem se određivala razina citokina IL-6, IL-8, IFNγ, TNFα u majčinom mlijeku cilj je bio utvrditi odnos između razina citokina i čimbenika kao što su mikrobiota humanog mlijeka, klinička dijagnoza, sadržaja prehrambenih tvari u humanom mlijeku, dob majke, paritet, spol djeteta te prehrana majke i konzumacija slatkiša (220). Kliničke bolesti bile su snažno povezane s hranjivim tvarima u mlijeku (mast, ugljikohidrati), ali ne i prisutnošću bakterijskih patogena (kao što je *Klebsiella oxytoca*). Nasuprot tome, bakterijski patogeni su povezani s odabranim hranjivim tvarima, ali ne i s identificiranim citokinima. Citokini su bili u visokoj korelaciji s proučavanim nutrijentima majčinog mlijeka. Nalazi te studije sugeriraju da na prisutnost i koncentraciju citokina snažno

utjeće majčina prehrana (izravno) kao i vanjski čimbenici (neizravno) poput dobi majke i metaboličkog profila (220).

Zanimljiv je podatak o utjecaju dobi na koncentracije interleukina (IL)-1 β i IL-6, koje su bile više u kolostrumu majki starije dobi u odnosu na majke adolescentice (221).

Obzirom na sve navedeno, citokinski sastav mlijeka je vrlo promjeniv te ovisi kako o duljini laktacije, tako i o brojnim čimbenicima majke i djeteta što se refletiralo i na rezultate ove studije. Naime, nismo zabilježili mjerljive razine citokina u svima uzorcima, kao niti konzistentne koncentracije unutar pojedinih skupina što ne umanjuje njihovu ulogu u zaštiti dojenčeta i razvoju njihova imunološkog sustava, ali potencijalno odražava činjenicu da se radilo o kasnom zreлом mlijeku.

7. Zaključci

Na temelju rezultata istraživanja u okviru prikazane doktorske disertacija možemo donjeti slijedeće zaključke:

1. Dominantno obilježje staničnih frekvencija u mlijeku je njihova visoka varijabilnost, bez uvjerljive evolucije staničnih profila tijekom laktacije (rana vs. kasna laktacija, podaci nisu prikazani), zbog čega su citometrijski podaci za oboljele skupno analizirani. U općim karakteristikama, $CD4^+$ stanice brojnije su od $CD8^+$ stanica u T populaciji, u obje faze bez značajne razlike među oboljelima i zdravima.
2. Mlijeko majki oboljele djece u akutnoj fazi ima značajno manje $CD8^+$ citotoksičnih T limfocita u odnosu na mlijeko majki zdrave djece. U oporavku, udio $CD8^+$ T stanica značajno raste približavajući se ponovno kontrolnim proporcijama. Istodobno, ovaj porast udjela $CD8^+$ T stanica tijekom oporavka praćen je zrcalnim padom udjela $CD4^+$ T stanica.
3. U fazi oporavka, vidljivi su također relativno niži udjeli $CD3^+$ limfocita i NKT stanica za oboljelu djecu u usporedbi s kontrolama u istom intervalu, no bez značajnog hoda frekvencija između akutne i konvalescentne faze oboljelih.
4. U fazi oporavka razina IgG2 i IgM u mlijeku pozitivno korelira s frekvencijama $CD4^+$ T stanica. Razina IgM u oporavku dodatno je povezana s udjelom T stanica i B stanica.
5. U oboljelih, faza oporavka obilježena je značajnim padom $V\delta 2^+/V\delta 1^+$ omjera u parnim mjerenjima. Viši CRP djeteta povezan je s višim udjelom $\gamma\delta$ T stanica u mlijeku tijekom akutne faze bolesti, a u oporavku zapažen je pad frekvencije $CD3^+V\delta 2^+$ stanica u djece s višim leukocitima
6. U obje faze, razina IgA povezana je pozitivno s udjelom i brojnošću $V\delta 2^+$ stanica u mlijeku, kako u akutnoj fazi bolesti, tako i u oporavku. Za ostale Ig klase, zastupljenost različitih vrsta $\gamma\delta$ T stanica u mlijeku uglavnom inverzno zrcali Ig koncentracije.

7. Pojedini razredi imunoglobulina bitno se razlikuju svojom zastupljenošću i tipičnim masenim koncentracijama, koje u ljudskom mlijeku variraju preko 4 reda veličine neovisno o statusu čeda. IgE je najoskudnije zastupljen, a slijede ga, u rastućem nizu, IgG4 i IgG3. Tipično za sekretorne produkte, IgA je snažno zastupljen, a najviše masene koncentracije postižu IgG2, IgG1 i IgM. Istovjetan redoslijed prisutan je u obje skupine majki, neovisno o statusu čeda: $\text{IgE} < \text{IgG4} < \text{IgG3} < \text{IgA} < \text{IgG2} < \text{IgG1} < \text{IgM}$.
8. Utvrdili smo značajnu povezanost koncentracije pojedinih razreda imunoglobulina neovisno o statusu čeda. Koncentracije IgM i IgE snažno su pozitivno korelirane, unatoč različitim skalama, a koncentracija IgE zrcali IgG2, u manjem opsegu i IgG1. Ovi temeljni principi prepoznatljivi su u obje vremenske točke, kako u akutnoj fazi bolesti djeteta, tako i u konvalescentnoj fazi.
9. Analizom glavnih komponenti utvrđeno je grupiranje i segregacija uzoraka mlijeka prema statusu djeteta duž prve glavne komponente (PC1, zdrava vs. oboljela), koja prima najveći doprinos iz IgG1, IgG2 i IgE. Nadalje, koincidentni porast dobi majke duž prve komponente ukazuje na moguću ulogu dobi majke u oblikovanju Ig profila mlijeka pojedinih skupina. Analiza redundancije jasno ilustrira separaciju grupa duž gradijenta IgG1, IgG2, i IgG4, odnosno IgE, potvrđujući razliku u Ig profilu između dvije grupe ispitanica.
10. Mlijeko majki s oboljelom dojenčadi obilježeno je povišenom razinom ukupnog Ig kako u akutnoj, tako i u konvalescentnoj fazi, i to prvenstveno na račun selektivnog, asimetričnog neto-porasta pojedinih klasa Ig. Koncentracija IgE, IgG1, IgG2 i IgG4 značajno je viša u mlijeku majki čije je dojenče u akutnom infektu nego u mlijeku majki sa zdravim djetetom. Osim u akutnoj fazi, ova razlika perzistira u konvalescenciji, do kraja prvog mjeseca nakon infekta. Za IgA i IgM, koncentracije u mlijeku slične su u obje skupine majki duž cijelog trajanja istraživanja, barem u nestratificiranoj analizi.
11. Izravna usporedba Ig profila ovih skupina, međutim, bila je otežana razlikama u laktacijskoj dobi, paritetu majki, i prehrani između zdrave i oboljele djece. Kasniji laktacijski interval osobito je karakteriziran nedostatkom opažanja za skupinu zdrave djece, i gotovo svi podaci za laktacijsku dob >5 mj. dolaze od oboljele dojenčadi. Zamjećena su dva obrasca promjena Ig:

- i. Nakon stratifikacije po laktacijskoj dobi (rana laktacija) i dalje je prisutna značajno viša razina IgG1 i IgG2 u mlijeku majki s djetetom u akutnoj fazi bolesti u usporedbi s majkama zdrave djece podudarne dojenačke dobi, sličnog redoslijeda poroda, identične prehrane, i sličnog izlaganja duhanskom dimu. U konvalescentnoj fazi, perzistira viša razina mliječnog IgG2, ali ne i IgG1 u usporedbi s kontrolnim mjerenjem u skupini zdrave djece, uz slične razine svih preostalih klasa Ig u obje skupine. Za kasnu laktaciju (>5 mj.), direktna usporedba Ig profila mlijeka majki zdrave i oboljele dojenčadi preostaje za buduće istraživanje, prvenstveno zbog nedostatka podudarne kontrolne skupine u ovom istraživanju.
 - ii. Za razliku od IgG1 i IgG2, dinamika IgE i IgG4 varira s trajanjem laktacije, formirajući (pseudo)gradijent u vremenu: oba slijede postupni porast od rane prema kasnoj laktaciji, kada postižu značajno više vrijednosti u usporedbi sa ranim laktacijskim intervalom. Pri tom, oba kulminiraju u oporavku: IgG4 raste dijelom već u akutnoj fazi, uz dodatnu konsolidaciju u konvalescentnoj fazi kasne laktacije, dok je porast IgE odgođen i jasnije izražen u oporavku nego akutnoj fazi.
12. Obzirom na dobivene podatke period od 4-6 tjedana u ovom istraživanju bio je prekratak za normalizaciju razina Ig na kontrolne vrijednosti, unatoč potpunoj kliničkoj konvalescenciji djeteta.
13. U demografskom i kliničkom smislu, oboljela djeca iz rane i kasne dojenačke dobi i njihove majke slični su u glavnini analiziranih obilježja, uz neizbježne razlike u prehrani djeteta. Osim toga utvrđeno je da je starija dojenčad (>5 mj.) češće bila febrilna u akutnoj fazi nego mlađa, uz trend višeg serumskog CRP .
14. Za ponovljena mjerenja i parne usporedbe unutar dviju skupina majki, nije bilo značajnih promjena u koncentraciji Ig u kontrolnom intervalu (4-6 tjedana), niti u majki sa zdravom djecom, niti u majki s oboljelom djecom (nestratificirana analiza). Za razliku od toga, u stratificiranoj analizi kod majki oboljele djece u ranoj dojenačkoj dobi, zabilježen je značajan pad koncentracije IgM u kontrolnom intervalu između akutne i konvalescentne faze.
15. Korelacija Ig profila i općih podataka dobivene su slijedeće poveznice:

- i. Viša koncentracija IgM u mlijeku majke povezana je s nižom koncentracijom CRP u serumu djeteta. Isti rezultat perzistira za mjerenja IgM u obje vremenske točke
 - ii. Viša koncentracija IgM i IgA u mlijeku majke povezana je sa značajno nižim brojem L u krvi djeteta u akutnoj fazi, a relacija između L djeteta i IgM perzistira marginalno i u konvalescenciji.
 - iii. Starije majke imaju niži IgM u mlijeku, i ta je dobna razlika vidljiva o oba mjerenja.
 - iv. U majki pušača pronađen je konzistentno niži IgG2 u akutnoj i konvalescentnoj fazi.
 - v. Febrilitet djeteta u akutnoj fazi povezan je koncentracijom IgG3 u mlijeku majke: majke s afebrilnim djetetom imaju višu razinu IgG3 u mlijeku od majki s oboljelim, ali febrilnim dojenčecom.
 - vi. Koncentracija IgG2 i IgG3 (prvo mjerenje) raste s višom dobi majke
 - vii. Koncentracija IgG4 opada s laktacijskom dobi: dulje dojenje povezano je s nižom razinom IgG4 u mlijeku
10. U akutnoj fazi bolesti, učestalost IL-1B⁺ i IL-6⁺ uzoraka mlijeka značajno je niža među oboljelima nego zdravim kontrolama, a mjerljive razine izmjerene su u 1/30 (IL-1B) do 1/5 (IL-6) svih uzoraka mlijeka majki oboljele djece. U kontrolnom intervalu, frekvencija IL-1B⁺ i IL-6⁺ uzoraka raste u mlijeku majki oboljele djece i u oporavku je ponovno podjednaka ili slična kontrolnim uzorcima. U mlijeku majki zdrave djece, mjerljive razine (> LLOQ) IL-1B i IL-6 zabilježene su u 1/3 do 1/2 uzoraka, bez značajne evolucije u kontrolnom intervalu.
11. Među majkama oboljele djece, razdioba i evolucija mjerenih vrijednosti IL-6 u mlijeku povezana je s upalnim biljezima dojenčeta. Porast IL-6 u oporavku poglavito je vidljiv u mlađih majki i majki djece s blagom leukocitozom ili urednim leukocitima, kao i u majki s višim IgG4 akutne faze. Istodobno, majke s mjerljivim IL-6 također pokazuju više razine mliječnog IgE i IgG2 u konvalescenciji. Naprotiv, u starijih majki i majki oboljele djece s izaženijom leukocitozom nema oporavka IL-6 u kontrolnom

intervalu, a suprimiran IL-6 češće perzistira tijekom konvalescentne faze, uz niži mliječni IgE i IgG2.

12. Aktna faza obilježena je gotovo nemjerljivim vrijednostima IL1B, s reverzijom prema kontrolnim frakcijama u oporavku. Suprotno IL-6, majke s mjerljivim IL-1B u oporavku pokazuju značajno niže razine mliječnog IgE.
13. Dinamika TNF u mlijeku majki oboljele djece također je slična IL-1B i IL-6. U kontrolnom intervalu i fazi oporavka, vidljiva je reverzija prema kontrolnoj razdiobi. Pri tom, oporavak TNF u konvalescenciji povezan je sa značajno kraćom laktacijom, dok je perzistentna supresija TNF značajno češća u kasnoj laktaciji.

8. Sažetak

Ciljevi istraživanja: Odrediti utjecaj akutne infekcije dojančeta na fenotip i zastupljenost subpopulacija limfocita, te citokinski i imunoglobulinski sastav majčinog mlijeka.

Nacrt studije: Studija je ustrojena kao prospektivno kohortno istraživanje.

Ispitanici i metode: U istraživanju je sudjelovalo 43 majke koje su podijeljene u dvije skupine, prvu skupinu su činile 28 majki koje su bile zdrave, a dojile su bolesnu djecu. Drugu kontrolnu skupinu je činilo 15 majki koje su bile zdrave i dojile su zdravu djecu. Protočnom citometrijom je određen imunofenotip te udjeli limfocita izoliranih iz stanične frakcije 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) te određen citokinski (IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17A, TNF α) i imunoglobulinski (IgA, IgE, IgG₁₋₄, IgM) sastav vodene frakcije mlijeka pomoću Luminex tehnologije.

Rezultati: Analizom glavnih komponenti utvrđeno je grupiranje i segregacija uzoraka mlijeka prema statusu djeteta duž prve glavne komponente (PC1, zdrava vs. oboljela), koja prima najveći doprinos iz IgG1, IgG2 i IgE. Koncentracija IgE, IgG1, IgG2 i IgG4 značajno je viša u mlijeku majki čije je dojenče u akutnom infektu nego u mlijeku majki sa zdravim djetetom te ova razlika perzistira u konvalescenciji. Kod majki oboljele djece u ranoj dojenačkoj dobi, zabilježen je značajan pad koncentracije IgM u kontrolnom intervalu između akutne i konvalescentne faze. U istih majki utvrđene su značajno manje CD8⁺ T limfocita u odnosu na mlijeko majki zdrave djece. U oporavku, udio CD8⁺ T stanica značajno raste približavajući se ponovno kontrolnim proporcijama te je praćen zrcalnim padom udjela CD4⁺ T stanica. U fazi oporavka, vidljivi su također relativno niži udjeli CD3⁺limfocita i NKT stanica za oboljelu djecu u usporedbi s kontrolama u istom intervalu, no bez značajnog hoda frekvencija između akutne i konvalescentne faze oboljelih. U fazi oporavka razina IgG2 i IgM u mlijeku pozitivno korelira s frekvencijama CD4⁺ T stanica. Razina IgM u oporavku dodatno je povezana s udjelom T stanica i B stanica. U oboljelih, faza oporavka obilježena je značajnim padom V $\delta 2$ ⁺/V $\delta 1$ ⁺ omjera u parnim mjerenjima. Razine citokina nisu izmjerene u svim analiziranim uzorcima, te je suprotno očekivanjima u akutnoj fazi bolesti učestalost IL-1B⁺ i IL-6⁺ uzoraka mlijeka značajno je niža među oboljelima nego zdravim kontrolama.

Zaključak: Ovo istraživanje je pokazalo da se majčino mlijeko staničnim, imunoglobulinskim i citokinskim sastavom mijenja tijekom akutne infekcije dojenčeta,

međutim period od 4-6 tjedana u ovom istraživanju se pokazao prekratkim za normalizaciju razine Ig na kontrolne vrijednosti, unatoč potpunoj kliničkoj konvalescenciji djeteta.

Ključne riječi: dojenje, imunost, infekcija

9. Summary

Research objectives: The objective of the research was to determine the influence of the acute infant infection on the phenotype and abundance of lymphocyte subpopulations, as well as the cytokine and immunoglobulin composition in the breast milk.

Study design: The study was designed as a prospective cohort study.

Subjects and methods: The research included 43 mothers divided into two groups. The first group consisted of 28 healthy mothers breastfeeding sick children. The second control group consisted of 15 healthy mothers breastfeeding healthy children. Flow cytometry was used to determine immunophenotype, as well as proportions of lymphocytes isolated from the cell fraction of breast milk (total T lymphocytes, CD4 helper lymphocytes, CD8 cytotoxic lymphocytes, NK cells, $\delta 1$ and $\delta 2$ populations of $\gamma\delta$ T lymphocytes, B cells). Also, cytokine (IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17A, TNF α) and immunoglobulin (IgA, IgE, IgG1-4, IgM) composition of the milk water fraction were determined by using Luminex technology.

Results: Principal component analysis showed that there was a grouping and segregation of milk samples by infant status along the first principal component (PC1, healthy vs. sick), which received the largest contribution from IgG1, IgG2 and IgE. The concentration of IgE, IgG1, IgG2 and IgG4 was significantly higher in the milk of mothers whose infants had an acute infection than in the milk of those with healthy children. This difference persisted during convalescence. In case of mothers whose children were affected during early infancy, a significant decrease in IgM concentration was observed in the time interval between the acute and the convalescent phase. Significantly fewer CD8⁺ T lymphocytes were found in the milk of the same mothers compared to the milk of mothers who were breastfeeding healthy children. In the recovery phase, the proportion of CD8⁺ T cells increased significantly and approached the control proportions, while the proportion of CD4⁺ T cells decreased. Relatively lower proportions of CD3⁺ lymphocytes and NKT cells were also observed in the milk of mothers with affected children compared to the control milk samples collected during the same period, but without significant fluctuations in cell frequencies between the acute and recovery phases of the affected children. In the recovery phase, the levels of IgG2 and IgM positively correlated with the frequency of CD4⁺ T cells. The IgM level in the recovery phase was also related to the proportion of T and B cells. During the recovery phase, the milk of mothers with affected children was characterised by a significant decrease in the V $\delta 2$ ⁺/V $\delta 1$ ⁺ ratio in paired measurements. Cytokine levels were not measured in all samples analysed.

Contrary to expectations, the frequency of IL-1 β ⁺ and IL-6⁺ milk samples in the acute phase was significantly lower in mothers of affected children compared to mothers of healthy breastfed children.

Conclusion: This study has shown that the cellular, immunoglobulin and cytokine composition of breast milk changes during acute infection of an infant. However, the period of 4-6 weeks proved to be too short for the normalisation of Ig levels to healthy control values, despite the complete clinical convalescence of the child.

Key words: breastfeeding, immunity, infection

10. Literatura

1. Mardešić D, i sur. *Pedijatrija*. 8. Zagreb: Školska knjiga; 2016.
2. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. 635 [Internet]. 12. rujan 2015. [citirano 29. kolovoz 2023.]; Dostupno na: <http://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/25981>
3. Lawrence RA, Lawrence RM. *Breastfeeding: a guide for the medical profession*. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. 975 str.
4. Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir* [Internet]. 28. lipanj 2017.;39(2). Dostupno na: <https://www.pediatrmedchir.org/pmc/article/view/155>
5. Bošnjak Pavičić A. Program podrške dojenju u jedinicama intenzivne neonatalne skrbi: koraci i izazovi. *Paediatr Croat*. 62(1):66–72.
6. Lokossou GAG, Kouakanou L, Schumacher A, Zenclussen AC. Human Breast Milk: From Food to Active Immune Response With Disease Protection in Infants and Mothers. *Front Immunol*. 05. travanj 2022.;13:849012.
7. Breastfeeding [Internet]. [citirano 27. veljača 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/health-topics/breastfeeding>
8. Carr LE, Virmani MD, Rosa F, Munblit D, Matazel KS, Elolimy AA, i ostali. Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Front Immunol*. 12. veljača 2021.;12:604080.
9. Armano G, Gracin I, Jovančević M. *Priručnik za dojenje*. Grad Zagreb Gradski Ured Za Zdr. 2018.;1. izdanje.
10. Iwuagwu C, Chen MJ, Hoyt-Austin AE, Kair L, Fix M, Schwarz EB. Awareness of the Maternal Health Benefits of Lactation Among U.S. Pregnant Individuals. *Womens Health Issues*. 01. svibanj 2024.;34(3):283–90.
11. Mathur NB, Dhingra D. Breastfeeding. *Indian J Pediatr*. veljača 2014.;81(2):143–9.
12. Dennis CL. Breastfeeding Initiation and Duration: A 1990-2000 Literature Review. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 01. siječanj 2002.;31(1):12–32.
13. Čatipović M, Mikšić Š, Fureš R, Puharić Z, Pavlović D. Deficiencies in the Intentions, Attitudes, and Knowledge of Future Healthcare Professionals Regarding Breastfeeding. *Children*. 21. srpanj 2023.;10(7):1256.
14. Mikšić Š, Konjarik Z, Kralj-Vasilj M, Juranić B, Pavlović D. Interventions of Health Visitors in Making a Decision About Breastfeeding. *Southeast Eur Med J*. 26. svibanj 2017.;1(1):130–5.
15. Witkowska-Zimny M, Kamińska-El-Hassan E, Wróbel E. Milk Therapy: Unexpected Uses for Human Breast Milk. *Nutrients* [Internet]. svibanj 2019. [citirano 23. veljača 2024.];11(5). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6567207/>

16. Molès JP, Tuaillon E, Kankasa C, Bedin AS, Nagot N, Marchant A, i ostali. Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr Allergy Immunol*. 01. ožujak 2018.;29(2):133–43.
17. Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, Michaelsen KF, i ostali. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. srpanj 2009. [citirano 23. rujan 2024.];49(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19502997/>
18. Yi DY, Kim SY. Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. *Nutrients* [Internet]. rujan 2021. [citirano 18. veljača 2024.];13(9). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8471419/>
19. Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 13. srpanj 2017. [citirano 09. kolovoz 2023.];22. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28717367/>
20. Lokossou GA, Kouakanou L, Schumacher A, Zenclussen AC. Human Breast Milk: From Food to Active Immune Response With Disease Protection in Infants and Mothers. *Front Immunol* [Internet]. 05. travanj 2022. [citirano 24. rujan 2024.];13. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35450064/>
21. Ninkina N, Kukharsky MS, Hewitt MV, Lysikova EA, Skuratovska LN, Deykin AV, i ostali. Stem cells in human breast milk. *Hum Cell*. srpanj 2019.;32(3):223–30.
22. Prentice AM. Breastfeeding in the Modern World. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2022. [citirano 29. kolovoz 2023.];78 Suppl 2. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35679837/>
23. Lessen R, Kavanagh K. Position of the academy of nutrition and dietetics: promoting and supporting breastfeeding. *J Acad Nutr Diet* [Internet]. ožujak 2015. [citirano 18. veljača 2024.];115(3). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25721389/>
24. Gleeson JP, Chaudhary N, Fein KC, Doerfler R, Hredzak-Showalter P, Whitehead KA. Profiling of mature-stage human breast milk cells identifies six unique lactocyte subpopulations. *Sci Adv*. 29. lipanj 2022.;8(26):eabm6865.
25. Hassiotou F, Geddes DT. Immune Cell–Mediated Protection of the Mammary Gland and the Infant during Breastfeeding1234. *Adv Nutr*. 07. svibanj 2015.;6(3):267–75.
26. Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM, McKinley LT, Higgins RD, Langer JC, i ostali. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics* [Internet]. listopad 2007. [citirano 22. rujan 2024.];120(4). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17908750/>
27. Belfort MB, Anderson PJ, Nowak VA, Lee KJ, Molesworth C, Thompson DK, i ostali. Breast milk feeding, brain development, and neurocognitive outcomes: a 7-year longitudinal study in infants born <30 weeks' gestation. *J Pediatr*. listopad 2016.;177:133.

28. Lapidaire W, Lucas A, Clayden JD, Clark C, Fewtrell MS. Human milk feeding and cognitive outcome in preterm infants: the role of infection and NEC reduction. *Pediatr Res* [Internet]. travanj 2022. [citirano 22. rujan 2024.];91(5). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34168271/>
29. Sullivan G, Vaher K, Blesa M, Galdi P, Stoye D, Quigley A, i ostali. Breast Milk Exposure is Associated With Cortical Maturation in Preterm Infants. *Ann Neurol* [Internet]. ožujak 2023. [citirano 22. rujan 2024.];93(3). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36412221/>
30. Hassiotou F, Hepworth AR, Metzger P, Lai CT, Trengove N, Hartmann PE, i ostali. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin Transl Immunol*. travanj 2013.;2(4):e3.
31. Geddes DT, Gridneva Z, Perrella SL, Mitoulas LR, Kent JC, Stinson LF, i ostali. 25 Years of Research in Human Lactation: From Discovery to Translation. *Nutrients* [Internet]. rujan 2021. [citirano 05. kolovoz 2024.];13(9). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8465002/>
32. Ramsay D, Kent J, Owens R, Hartmann P. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics* [Internet]. veljača 2004. [citirano 22. rujan 2024.];113(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14754950/>
33. Bode L, McGuire M, Rodriguez JM, Geddes DT, Hassiotou F, Hartmann PE, i ostali. It's Alive: Microbes and Cells in Human Milk and Their Potential Benefits to Mother and Infant. *Adv Nutr*. 01. rujan 2014.;5(5):571–3.
34. Hassiotou F, Geddes D, Hartmann P. Cells in human milk: state of the science. *J Hum Lact Off J Int Lact Consult Assoc* [Internet]. svibanj 2013. [citirano 23. veljača 2024.];29(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23515088/>
35. Protection, promotion and support of breastfeeding in Europe: a blueprint for action [Internet]. [citirano 24. veljača 2024.]. Dostupno na: <https://www.aeped.es/sites/default/files/6-newblueprintprinter.pdf>
36. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*. veljača 2013.;60(1):49.
37. Pang WW, Hartmann PE. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. prosinac 2007.;12(4):211–21.
38. Nuzzi G, Trambusti I, Di Cicco M, Peroni D. Breast milk: more than just nutrition! *Minerva Pediatr* [Internet]. travanj 2021. [citirano 27. veljača 2024.];73(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33880902/>
39. Turck D. Breast feeding: health benefits for child and mother. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr* [Internet]. prosinac 2005. [citirano 29. kolovoz 2023.];12 Suppl 3. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16300936/>
40. Bowatte G, Tham R, Allen KJ, Tan DJ, Lau M, Dai X, i ostali. Breastfeeding and childhood acute otitis media: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr Oslo*

- Nor 1992 [Internet]. prosinac 2015. [citirano 29. kolovoz 2023.];104(467). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26265016/>
41. Horta BL, Victora CG, Organization WH. Short-term effects of breastfeeding: a systematic review on the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality [Internet]. World Health Organization; 2013 [citirano 29. kolovoz 2023.]. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95585>
 42. Tenenbaum Weiss Y, Ovnat Tamir S, Globus O, Marom T. Protective Characteristics of Human Breast Milk on Early Childhood Otitis Media: A Narrative Review. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med.* veljača 2024.;19(2):73–80.
 43. Meek JY, Noble L, Section on Breastfeeding. Policy Statement: Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics.* 27. lipanj 2022.;150(1):e2022057988.
 44. Krol KM, Grossmann T. Psychological effects of breastfeeding on children and mothers. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* [Internet]. kolovoz 2018. [citirano 29. kolovoz 2023.];61(8). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29934681/>
 45. Horta BI, Loret de Mola C, Victora CG. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr Oslo Nor 1992* [Internet]. prosinac 2015. [citirano 29. kolovoz 2023.];104(467). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26211556/>
 46. Davis JA, Baumgartel K, Morowitz MJ, Giangrasso V, Demirci JR. The Role of Human Milk in Decreasing Necrotizing Enterocolitis Through Modulation of the Infant Gut Microbiome: A Scoping Review. *J Hum Lact Off J Int Lact Consult Assoc* [Internet]. studeni 2020. [citirano 27. veljača 2024.];36(4). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32845798/>
 47. Amitay EL, Keinan-Boker L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-analysis and Systematic Review. *JAMA Pediatr.* 01. lipanj 2015.;169(6):e151025–e151025.
 48. Henrick BM, Yao XD, Nasser L, Roozrogousheh A, Rosenthal KL. Breastfeeding Behaviors and the Innate Immune System of Human Milk: Working Together to Protect Infants against Inflammation, HIV-1, and Other Infections. *Front Immunol.* 29. studeni 2017.;8:298144.
 49. Allam NA, Megrin WAA, Talat AM. The Effect of Topical Application of Mother Milk on Separation of Umbilical Cord for Newborn Babies. *Am J Nurs Sci.* listopad 2015.;4(5):288–96.
 50. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* [Internet]. 15. lipanj 2010. [citirano 23. veljača 2024.];50(12). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20455694/>

51. Piskorska-Jasiulewicz MM, Witkowska-Zimny M. Non-nutritional use of breast milk. *Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online* [Internet]. 04. listopad 2017. [citirano 23. veljača 2024.];71(0). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29039349/>
52. Truchet S, Honvo-Houéto E. Physiology of milk secretion. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. kolovoz 2017. [citirano 28. veljača 2024.];31(4). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29221566/>
53. Chowdhury R, Sinha B, Sankar MJ, Taneja S, Bhandari N, Rollins N, i ostali. Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 [Internet]. prosinac 2015. [citirano 29. kolovoz 2023.];104(467). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26172878/>
54. Hannan FM, Elajnaf T, Vandenberg LN, Kennedy SH, Thakker RV. Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. siječanj 2023. [citirano 27. veljača 2024.];19(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36192506/>
55. Jordan SJ, Na R, Johnatty SE, Wise LA, Adami HO, Brinton LA, i ostali. Breastfeeding and Endometrial Cancer Risk: An Analysis From the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium. *Obstet Gynecol.* lipanj 2017.;129(6):1059–67.
56. Anue D, Norat T, Romundstad P, Vatten LJ. Breastfeeding and the maternal risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD* [Internet]. veljača 2014. [citirano 29. kolovoz 2023.];24(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24439841/>
57. Bobrow KL, Quigley MA, Green J, Reeves GK, Beral V. Persistent effects of women's parity and breastfeeding patterns on their body mass index: results from the Million Women Study. *Int J Obes.* svibanj 2013.;37(5):712–7.
58. Kramer MS, Kakuma R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. kolovoz 2012. [citirano 24. veljača 2024.];2012(8). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7154583/>
59. Stanley IP, Mei C, Gowri R, Priscilla C, Nombulelo M, DeVine D, i ostali. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid ReportTechnology Assess.* travanj 2007.;(153):1–186.
60. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 01. siječanj 2002.;7(1):49–66.
61. Krešić G, Dujmović M, Mandić ML, Mrduljaš N. Majčino mlijeko: sastav masnih kiselina i prehrana dojlja. | *Dairy / Mljekarstvo* | EBSCOhost [Internet]. Sv. 63. 2013 [citirano 09. kolovoz 2024.]. str. 128. Dostupno na: <https://openurl.ebsco.com/contentitem/gcd:89936107?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:gcd:89936107>
62. Saleem M, Martin H, Coates P. Prolactin Biology and Laboratory Measurement: An Update on Physiology and Current Analytical Issues. *Clin Biochem Rev.* veljača 2018.;39(1):3.

63. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* [Internet]. listopad 2000. [citirano 26. veljača 2024.];80(4). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11015620/>
64. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija* [Internet]. Sv. 13. 2017 [citirano 26. veljača 2024.]. Dostupno na: <https://www.medicinskanaklada.hr/medicinska-fiziologija-13-izd>
65. Uvnäs-Moberg K, Eriksson M. Breastfeeding: physiological, endocrine and behavioural adaptations caused by oxytocin and local neurogenic activity in the nipple and mammary gland. *Acta Pædiatrica*. 01. svibanj 1996.;85(5):525–30.
66. Dimitraki M, Tsikouras P, Manav B, Gioka T, Koutlaki N, Zervoudis S, i ostali. Evaluation of the effect of natural and emotional stress of labor on lactation and breast-feeding. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. veljača 2016. [citirano 26. veljača 2024.];293(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26112355/>
67. Uvnäs-Moberg K, Ekström-Bergström A, Buckley S, Massarotti C, Pajalic Z, Luegmair K, i ostali. Maternal plasma levels of oxytocin during breastfeeding—A systematic review. *PLoS ONE* [Internet]. 2020. [citirano 27. veljača 2024.];15(8). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7406087/>
68. Pajewska-Szmyt M, Sinkiewicz-Darol E, Gadzała-Kopciuch R. The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk. *Environ Sci Pollut Res Int*. 28. siječanj 2019.;26(8):7405.
69. Tauber KA. Human Milk and Lactation: Background, Physiology, Human Milk and Preterm Infant. 07. ožujak 2024. [citirano 25. rujan 2024.]; Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/1835675-overview?form=fpf#a8>
70. Christian P, Smith ER, Lee SE, Vargas AJ, Bremer AA, Raiten DJ. The need to study human milk as a biological system. *Am J Clin Nutr*. svibanj 2021.;113(5):1063.
71. Ra S, Jk D, Za B. Multiple micronutrient supplementation during pregnancy and lactation in low-to-middle-income developing country settings: impact on pregnancy outcomes. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2014. [citirano 22. rujan 2024.];65(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25227399/>
72. Valentine CJ, Dingess KA, Kleiman J, Morrow AL, Rogers LK. A Randomized Trial of Maternal Docosahexaenoic Acid Supplementation to Reduce Inflammation In Extremely Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. rujan 2019.;69(3):388.
73. Carretero-Krug A, Montero-Bravo A, Morais-Moreno C, Puga AM, Samaniego-Vaesken MI, Partearroyo T, i ostali. Nutritional Status of Breastfeeding Mothers and Impact of Diet and Dietary Supplementation: A Narrative Review. *Nutrients* [Internet]. 19. siječanj 2024. [citirano 22. rujan 2024.];16(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38276540/>
74. Karbasi S, Bahrami A, Asadi Z, Shahbeiki F, Naseri M, Zarban A, i ostali. The association of maternal dietary quality and the antioxidant-proxidant balance of human milk. *Int Breastfeed J*. prosinac 2022.;17(1):1–9.

75. Word E, Yang N, Muhlhausler BS, Leghi GE, Netting MJ, Elmes MJ, i ostali. Acute changes to breast milk composition following consumption of high-fat and high-sugar meals. *Matern Child Nutr* [Internet]. srpanj 2021. [citirano 22. rujan 2024.];17(3). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33660402/>
76. Cregan MD, Fan Y, Appelbee A, Brown ML, Klopčič B, Koppen J, i ostali. Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell Tissue Res*. srpanj 2007.;329(1):129–36.
77. Hassioutu F, Beltran A, Chetwynd E, Stuebe AM, Aj AJ, Metzger P, i ostali. Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells Dayt Ohio* [Internet]. listopad 2012. [citirano 19. veljača 2024.];30(10). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22865647/>
78. International Milk Genomics Consortium [Internet]. [citirano 03. veljača 2024.]. Protective Cells in Milk: Maternal and Infant Infection. Dostupno na: <https://www.milkgenomics.org/?splash=protective-cells-in-breast-milk-for-the-infant-and-the-mother>
79. Riskin A, Almog M, Peri R, Halasz K, Sruogo I, Kessel A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res* [Internet]. veljača 2012. [citirano 19. veljača 2024.];71(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22258136/>
80. Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett*. 13. srpanj 2017.;22:11.
81. Haiden N, Ziegler EE. Human Milk Banking. *Ann Nutr Metab*. 28. prosinac 2016.;69(Suppl. 2):7–15.
82. Andreas NJ, Hyde MJ, Gomez-Romero M, Lopez-Gonzalez MA, Villaseñor A, Wijeyesekera A, i ostali. Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation. *Electrophoresis*. rujan 2015.;36(18):2269.
83. Holmlund U, Amoudruz P, Johansson MA, Haileselassie Y, Ongoiba A, Kayentao K, i ostali. Maternal country of origin, breast milk characteristics and potential influences on immunity in offspring. *Clin Exp Immunol*. prosinac 2010.;162(3):500.
84. Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lönnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. veljača 1991. [citirano 18. travanj 2024.];53(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1989413/>
85. Kim SY, Yi DY. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr*. 15. kolovoz 2020.;63(8):301–9.
86. Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 [Internet]. rujan 2005. [citirano 23. rujan 2024.];94(9). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16203669/>

87. George AD, Gay ML, Wlodek ME, Geddes DT. The importance of infants' lipid intake in human milk research. *Nutr Rev* [Internet]. 10. studeni 2021. [citirano 05. kolovoz 2024.];79(12). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33448303/>
88. Kent JC, Mitoulas LR, Cregan MD, Ramsay DT, Doherty DA, Hartmann PE. Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics* [Internet]. ožujak 2006. [citirano 20. veljača 2024.];117(3). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16510619/>
89. Haschke F, Haiden N, Thakkar SK. Nutritive and Bioactive Proteins in Breastmilk. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2016. [citirano 23. rujan 2024.];69 Suppl 2. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28103610/>
90. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*. 01. lipanj 2003.;77(6):1537S-1543S.
91. Lönnerdal B, Erdmann P, Thakkar SK, Sauser J, Destaillets F. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *J Nutr Biochem* [Internet]. ožujak 2017. [citirano 23. rujan 2024.];41. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27771491/>
92. Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in Carbohydrate Composition in Human Milk Over 4 Months of Lactation. *Pediatrics*. 01. ožujak 1993.;91(3):637–41.
93. Newburg DS, Walker WA. Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of Human Milk. *Pediatr Res*. siječanj 2007.;61(1):2–8.
94. Allen LH. B Vitamins in Breast Milk: Relative Importance of Maternal Status and Intake, and Effects on Infant Status and Function. *Adv Nutr*. svibanj 2012.;3(3):362.
95. Garofalo R. Cytokines in Human Milk. *J Pediatr*. 01. veljača 2010.;156(2):S36–40.
96. Khaldi N, Vijayakumar V, Dallas DC, Guerrero A, Wickramasinghe S, Smilowitz JT, i ostali. Predicting the Important Enzymes in Human Breast Milk Digestion. *J Agric Food Chem*. 12. ožujak 2014.;62(29):7225.
97. Shah U, Dickinson BL, Blumberg RS, Simister NE, Lencer WI, Walker WA. Distribution of the IgG Fc receptor, FcRn, in the human fetal intestine. *Pediatr Res*. veljača 2003.;53(2):295–301.
98. Bondt A, Rombouts Y, Selman MHJ, Hensbergen PJ, Reiding KR, Hazes JMW, i ostali. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics MCP*. studeni 2014.;13(11):3029–39.
99. Peitersen B, Bohn L, Andersen H. Quantitative determination of immunoglobulins, lysozyme, and certain electrolytes in breast milk during the entire period of lactation, during a 24-hour period, and in milk from the individual mammary gland. *Acta Paediatr Scand* [Internet]. rujan 1975. [citirano 25. veljača 2024.];64(5). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1172647/>

100. Campo JJ, Seppo AE, Randall AZ, Pablo J, Hung C, Teng A, i ostali. Human milk antibodies to global pathogens reveal geographic and interindividual variations in IgA and IgG. *J Clin Invest* [Internet]. 08. kolovoz 2024. [citirano 07. kolovoz 2024.];134(15). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11290967/>
101. Demers-Mathieu V, Underwood MA, Beverly RL, Nielsen SD, Dallas DC. Comparison of Human Milk Immunoglobulin Survival during Gastric Digestion between Preterm and Term Infants. *Nutrients* [Internet]. svibanj 2018. [citirano 25. veljača 2024.];10(5). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5986510/>
102. Smilowitz JT, Totten SM, Huang J, Grapov D, Durham HA, Lammi-Keefe CJ, i ostali. Human Milk Secretory Immunoglobulin A and Lactoferrin N-Glycans Are Altered in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *J Nutr.* prosinac 2013.;143(12):1906.
103. Kawano A, Emori Y. The relationship between maternal postpartum psychological state and breast milk secretory immunoglobulin A level. *J Am Psychiatr Nurses Assoc* [Internet]. veljača 2015. [citirano 25. veljača 2024.];21(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25589451/>
104. França EL, Calderon I de MP, Vieira EL, Morceli G, Honorio-França AC. Transfer of Maternal Immunity to Newborns of Diabetic Mothers. *Clin Dev Immunol.* 2012.;2012:928187.
105. Schlaudecker EP, Steinhoff MC, Omer SB, McNeal MM, Roy E, Arifeen SE, i ostali. IgA and Neutralizing Antibodies to Influenza A Virus in Human Milk: A Randomized Trial of Antenatal Influenza Immunization. *PLoS ONE* [Internet]. 2013. [citirano 07. kolovoz 2024.];8(8). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3743877/>
106. Abuidhail J, Al-Shudiefat AAR, Darwish M. Alterations of immunoglobulin G and immunoglobulin M levels in the breast milk of mothers with exclusive breastfeeding compared to mothers with non-exclusive breastfeeding during 6 months postpartum: The Jordanian cohort study. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc.* siječanj 2019.;31(1):e23197.
107. Maertens K, De Schutter S, Braeckman T, Baerts L, Van Damme P, De Meester I, i ostali. Breastfeeding after maternal immunisation during pregnancy: providing immunological protection to the newborn: a review. *Vaccine.* 01. travanj 2014.;32(16):1786–92.
108. Demers-Mathieu V, Huston RK, Markell AM, McCulley EA, Martin RL, Spooner M, i ostali. Differences in Maternal Immunoglobulins within Mother's Own Breast Milk and Donor Breast Milk and across Digestion in Preterm Infants. *Nutrients* [Internet]. travanj 2019. [citirano 25. veljača 2024.];11(4). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6521323/>
109. Smith-Norowitz TA, Drew H, Norowitz HM, Nowakowski M, Bluth EF, Durkin HG, i ostali. Detection of IgE anti-parvovirus antibodies in human breast milk. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. Spring 2008. [citirano 25. veljača 2024.];38(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18469364/>

110. Pellegrino MG, Bluth MH, Smith-Norowitz T, Fikrig S, Dj DJ, Moallem H, i ostali. HIV type 1-specific IgE in serum of long-term surviving children inhibits HIV type 1 production in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 20. ožujak 2002. [citirano 25. veljača 2024.];18(5). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11897038/>
111. Seroogy CM, Wara DW, Bluth MH, Dorenbaum A, White C, Durkin HG, i ostali. Cytokine profile of a long-term pediatric HIV survivor with hyper-IgE syndrome and a normal CD4 T-cell count. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. studeni 1999. [citirano 25. veljača 2024.];104(5). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10550751/>
112. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Nw NW, Bengtén E, i ostali. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* [Internet]. kolovoz 2009. [citirano 25. veljača 2024.];10(8). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19561614/>
113. Lopez Leyva L, Brereton NJB, Koski KG. Emerging frontiers in human milk microbiome research and suggested primers for 16S rRNA gene analysis. *Comput Struct Biotechnol J*. 08. prosinac 2020.;19:121–33.
114. Su Yeong K, Dae Yong Y. Analysis of the human breast milk microbiome and bacterial extracellular vesicles in healthy mothers. *Exp Mol Med*. 03. kolovoz 2020.;52(8):1288–97.
115. Notarbartolo V, Giuffrè M, Montante C, Corsello G, Carta M. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. svibanj 2022.;25(3):194–210.
116. Trend S, Jong E, Lloyd ML, Kok CH, Richmond P, Doherty DA, i ostali. Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PLoS ONE* [Internet]. 2015. [citirano 23. veljača 2024.];10(8). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4545889/>
117. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Front Microbiol* [Internet]. 20. travanj 2016. [citirano 14. listopad 2024.];7. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00492/full>
118. Jain L, Vidyasagar D, Xanthou M, Ghai V, Shimada S, Blend M. In vivo distribution of human milk leucocytes after ingestion by newborn baboons. *Arch Dis Child*. srpanj 1989.;64(7 Spec No):930.
119. Hassiotou F, Heath B, Ocal O, Filgueira L, Geddes D, Hartmann P, i ostali. Breastmilk stem cell transfer from mother to neonatal organs (216.4). [citirano 22. rujan 2024.]; Dostupno na: https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.28.1_supplement.216.4
120. Wirt DP, Adkins LT, Palkowetz KH, Schmalstieg FC, Goldman AS. Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry* [Internet]. 1992. [citirano 22. rujan 2024.];13(3). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1533582/>

121. Goldman AS, Chheda S, Keeney SE, Schmalstieg FC. Immunology of Human Milk and Host Immunity. *Fetal Neonatal Physiol.* 2011.;1690–701.
122. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Osnovna imunologija*. 4. izd. 2013.
123. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, i ostali. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* kolovoz 2014.;14(8):571–8.
124. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 16. listopada 2018.;49(4):595–613.
125. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 15. studeni 1989.;74(7):2527–34.
126. Shiv Pillai AKA. *Stanična i molekularna imunologija*. Medicinska naklada; 2018.
127. Cansever D, Petrova E, Krishnarajah S, Mussak C, Welsh CA, Mildenerberger W, i ostali. Lactation-associated macrophages exist in murine mammary tissue and human milk. *Nat Immunol.* 01. srpanj 2023.;24(7):1098–109.
128. Wirt DP, Adkins LT, Palkowetz KH, Schmalstieg FC, Goldman AS. Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry.* 1992.;13(3):282–90.
129. *Imunologija* [Internet]. [citirano 08. kolovoz 2024.]. Dostupno na: https://www.sfzg.unizg.hr/_download/repository/Imunologija_skripta%5B2%5D.pdf
130. Rahman M, Bordoni B. *Histology, Natural Killer Cells*. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 08. kolovoz 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK565844/>
131. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 13. rujan 2017.;8:1124.
132. Natural Killer Cells | British Society for Immunology [Internet]. [citirano 08. kolovoz 2024.]. Dostupno na: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/natural-killer-cells>
133. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Innate Immunity*. U: *Molecular Biology of the Cell* 4th edition [Internet]. Garland Science; 2002 [citirano 08. kolovoz 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>
134. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 13. kolovoz 2018.;18(4):e27.
135. Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 21. siječanj 2015.;15(1):e9.
136. Di Lorenzo B, Ravens S, Silva-Santos B. High-throughput analysis of the human thymic V δ 1+ T cell receptor repertoire. *Sci Data.* 04. srpanj 2019.;6:115.

137. Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*. lipanj 2004.;20(6):735–45.
138. Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, Minato N, i ostali. $\gamma\delta$ T Cells and Their Potential for Immunotherapy. *Int J Biol Sci*. 10. siječanj 2014.;10(2):119–35.
139. Zarobkiewicz MK, Wawryk-Gawda E, Kowalska W, Janiszewska M, Bojarska-Junak A. $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Asthma: a Complicated Picture. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2021.;69(1):4.
140. Shiromizu CM, Jancic CC. $\gamma\delta$ T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection. *Front Immunol*. 16. listopad 2018.;9:2389.
141. Ma R, Yuan D, Guo Y, Yan R, Li K. Immune Effects of $\gamma\delta$ T Cells in Colorectal Cancer: A Review. *Front Immunol* [Internet]. 2020. [citirano 13. siječanj 2024.];11. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01600>
142. Chien Y hsiu, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2014.;32:121–55.
143. Nielsen MM, Witherden DA, Havran WL. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol*. prosinac 2017.;17(12):733–45.
144. Pizzolato G, Kaminski H, Tosolini M, Franchini DM, Pont F, Martins F, i ostali. Single-cell RNA sequencing unveils the shared and the distinct cytotoxic hallmarks of human TCRV δ 1 and TCRV δ 2 $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11. lipanj 2019.;116(24):11906–15.
145. Zarobkiewicz MK, Kowalska W, Roliński J, Bojarska-Junak AA. $\gamma\delta$ T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 15. svibanj 2019.;330:67–73.
146. Zarobkiewicz MK, Kowalska W, Halczuk P, Woś J, Jodłowska-Jędrych B, Rejdak K, i ostali. ROR γ T is overexpressed in iNKT and $\gamma\delta$ T cells during relapse in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 15. prosinac 2019.;337:577046.
147. Raute K, Strietz J, Parigiani MA, Andrieux G, Thomas OS, Kistner KM, i ostali. Breast Cancer Stem Cell-Derived Tumors Escape from $\gamma\delta$ T-cell Immunosurveillance In Vivo by Modulating $\gamma\delta$ T-cell Ligands. *Cancer Immunol Res*. 02. lipanj 2023.;11(6):810–29.
148. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology*. srpanj 2012.;136(3):283–90.
149. Moser B, Eberl M. $\gamma\delta$ T-APCs: a novel tool for immunotherapy? *Cell Mol Life Sci CMLS*. 15. svibanj 2011.;68(14):2443–52.
150. Mangan BA, Dunne MR, O'Reilly VP, Dunne PJ, Exley MA, O'Shea D, i ostali. Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human V δ 3 T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 01. srpanj 2013.;191(1):30–4.

151. Kang I, Kim Y, Lee HK. Double-edged sword: $\gamma\delta$ T cells in mucosal homeostasis and disease. *Exp Mol Med*. rujan 2023.;55(9):1895–904.
152. Caccamo N, Dieli F, Wesch D, Jomaa H, Eberl M. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells. *J Leukoc Biol*. travanj 2006.;79(4):663–6.
153. Li S, Li N, Wang C, Zhao Y, J J, Li X, i ostali. Gut Microbiota and Immune Modulatory Properties of Human Breast Milk *Streptococcus salivarius* and *S. parasanguinis* Strains. *Front Nutr* [Internet]. 22. veljača 2022. [citirano 09. kolovoz 2023.];9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35273986/>
154. Pauza CD, Riedel DJ, Gilliam BL, Redfield RR. Targeting $\gamma\delta$ T cells for immunotherapy of HIV disease. *Future Virol*. 01. siječanj 2011.;6(1):73–84.
155. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity*. 21. kolovoz 2009.;31(2):184–96.
156. Poggi A, Zocchi MR. $\gamma\delta$ T Lymphocytes as a First Line of Immune Defense: Old and New Ways of Antigen Recognition and Implications for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 11. studeni 2014.;5:575.
157. Lindstrand A, Smedman L, Gunnlaugsson G, Troye-Blomberg M. Selective compartmentalization of gammadelta-T lymphocytes in human breastmilk. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. kolovoz 1997.;86(8):890–1.
158. Atyeo C, Alter G. The multifaceted roles of breast milk antibodies. *Cell*. 18. ožujak 2021.;184(6):1486–99.
159. Gleeson M, Cripps AW. Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 01. rujan 2004.;42(1):21–33.
160. Perkkiö M, Savilahti E. Time of appearance of immunoglobulin-containing cells in the mucosa of the neonatal intestine. *Pediatr Res* [Internet]. kolovoz 1980. [citirano 24. veljača 2024.];14(8). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7191555/>
161. Takemura T, Eishi Y. Distribution of secretory component and immunoglobulins in the developing lung. *Am Rev Respir Dis*. siječanj 1985.;131(1):125–30.
162. Thrane PS, Rognum TO, Brandtzaeg P. Ontogenesis of the secretory immune system and innate defence factors in human parotid glands. *Clin Exp Immunol* [Internet]. studeni 1991. [citirano 24. veljača 2024.];86(2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1934601/>
163. Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, Andersen JT, Sandlie I, Blumberg RS. The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front Immunol*. 10. srpanj 2019.;10:1540.
164. Goonatileke E, Huang J, Xu G, Wu L, Smilowitz JT, German JB, i ostali. Human Milk Proteins and Their Glycosylation Exhibit Quantitative Dynamic Variations during Lactation. *J Nutr*. 16. svibanj 2019.;149(8):1317.

-
165. Hanson LÅ, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin Neonatol.* 01. kolovoz 2002.;7(4):275–81.
166. Sabbaj S, Ghosh MK, Edwards BH, Leeth R, Decker WD, Goepfert PA, i ostali. Breast milk-derived antigen-specific CD8⁺ T cells: an extralymphoid effector memory cell population in humans. *J Immunol Baltim Md 1950.* 01. ožujak 2005.;174(5):2951–6.
167. Fox A, Marino J, Amanat F, Oguntuyo KY, Hahn-Holbrook J, Lee B, i ostali. The IgA in milk induced by SARS-CoV-2 infection is comprised of mainly secretory antibody that is neutralizing and highly durable over time. *PLoS ONE.* 09. ožujak 2022.;17(3):e0249723.
168. Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr.* veljača 2010.;156(2 Suppl):S8-15.
169. Bedin AS, Molès JP, Rutagwera D, Nagot N, Kankasa C, Tylleskär T, i ostali. MAIT cells, TCR $\gamma\delta^+$ cells and ILCs cells in human breast milk and blood from HIV infected and uninfected women. *Pediatr Allergy Immunol.* 01. lipanj 2019.;30(4):479–87.
170. Jin YY, Wei Zhao null, Cao RM, Xi Wang null, Wu SM, Chen TX. Characterization of immunocompetent cells in human milk of Han Chinese. *J Hum Lact Off J Int Lact Consult Assoc.* svibanj 2011.;27(2):155–62.
171. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients.* 14. travanj 2011.;3(4):442.
172. Thai JD, Gregory KE. Bioactive Factors in Human Breast Milk Attenuate Intestinal Inflammation during Early Life. *Nutrients.* 23. veljača 2020.;12(2):581.
173. Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, i ostali. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 03. veljača 2014.;111(8):3074.
174. Rio-Aige K, Azagra-Boronat I, Castell M, Selma-Royo M, Collado MC, Rodríguez-Lagunas MJ, i ostali. The Breast Milk Immunoglobulinome. *Nutrients.* 26. svibanj 2021.;13(6):1810.
175. Gopalakrishna KP, Macadangdang BR, Rogers MB, Tometich JT, Firek BA, Baker R, i ostali. Maternal IgA protects against the development of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Nat Med.* 17. lipanj 2019.;25(7):1110.
176. Larson BL, Heary HL, Devery JE. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci.* travanj 1980.;63(4):665–71.
177. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal Immunol.* 05. listopad 2011.;4(6):603.
178. Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. *Rev Assoc Medica Bras* 1992. rujan 2016.;62(6):584–93.

179. Islam SKN, Ahmed L, Khan MNI, Huque S, Begum A, Yunus ABM. Immune components (IgA, IgM, IgG, immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc.* prosinac 2006.;48(6):543–8.
180. Moles L, Manzano S, Fernández L, Montilla A, Corzo N, Ares S, i ostali. Bacteriological, biochemical, and immunological properties of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* siječanj 2015.;60(1):120–6.
181. Meng X, Dunsmore G, Koleva P, Elloumi Y, Wu RY, Sutton RT, i ostali. The Profile of Human Milk Metabolome, Cytokines, and Antibodies in Inflammatory Bowel Diseases Versus Healthy Mothers, and Potential Impact on the Newborn. *J Crohns Colitis.* 12. studeni 2018.;13(4):431.
182. Keller MA, Heiner DC, Kidd RM, Myers AS. Local production of IgG4 in human colostrum. *J Immunol Baltim Md* 1950. travanj 1983.;130(4):1654–7.
183. Bahna SL, Keller MA, Heiner DC. IgE and IgD in human colostrum and plasma. *Pediatr Res.* kolovoz 1982.;16(8):604–7.
184. Duchén K, Björkstén B. Total IgE levels in human colostrum. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol.* veljača 1996.;7(1):44–7.
185. Rio-Aige K, Fernández-Bargalló A, Vegas-Lozano E, Miñarro-Alonso A, Castell M, Selma-Royo M, i ostali. Breast milk immune composition varies during the transition stage of lactation: characterization of immunotypes in the MAMI cohort. *Front Nutr.* 2023.;10:1252815.
186. Reddy V, Bhaskaram C, Raghuramulu N, Jagadeesan V. Antimicrobial factors in human milk. *Acta Paediatr Scand.* ožujak 1977.;66(2):229–32.
187. Mehta PD, Mehta SP, Isaacs CE. Distribution of IgG subclasses in human colostrum and milk. *Immunol Lett.* rujan 1989.;22(3):235–8.
188. Wright AL, Sherrill D, Holberg CJ, Halonen M, Martinez FD. Breast-feeding, maternal IgE, and total serum IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 01. rujan 1999.;104(3):589–94.
189. Msallam R, Balla J, Rathore APS, Kared H, Malleret B, Saron WAA, i ostali. Fetal mast cells mediate postnatal allergic responses dependent on maternal IgE. *Science.* 20. studeni 2020.;370(6519):941–50.
190. Hochwallner H, Alm J, Lupinek C, Johansson C, Mie A, Scheynius A, i ostali. Transmission of allergen-specific IgG and IgE from maternal blood into breast milk visualized with microarray technology. *J Allergy Clin Immunol.* studeni 2014.;134(5):1213.
191. Fernández-Buhigas I, Rayo N, Silos JC, Serrano B, Ocón-Hernández O, Leung BW, i ostali. Anti-SARS-CoV-2-specific antibodies in human breast milk following SARS-CoV-2 infection during pregnancy: a prospective cohort study. *Int Breastfeed J.* 18. siječanj 2024.;19:5.

192. Striker GAJ, Casanova LD, Nagao AT. [Influence of type of delivery on A, G and M immunoglobulin concentration in maternal colostrum]. *J Pediatr (Rio J)*. 2004.;80(2):123–8.
193. Moussa S, Jenabian MA, Gody JC, Léal J, Grésenguet G, Faou AL, i ostali. Adaptive HIV-Specific B Cell-Derived Humoral Immune Defenses of the Intestinal Mucosa in Children Exposed to HIV via Breast-Feeding. *PLoS ONE*. 21. svibanj 2013.;8(5):e63408.
194. Conti MG, Terreri S, Piano Mortari E, Albano C, Natale F, Boscarino G, i ostali. Immune Response of Neonates Born to Mothers Infected With SARS-CoV-2. *JAMA Netw Open*. 01. studeni 2021.;4(11):e2132563.
195. Pullen KM, Atyeo C, Collier ARY, Gray KJ, Belfort MB, Lauffenburger DA, i ostali. Selective functional antibody transfer into the breastmilk after SARS-CoV-2 infection. *Cell Rep*. 22. listopad 2021.;37(6):109959.
196. Czosnykowska-Łukacka M, Lis-Kuberka J, Królak-Olejniak B, Orczyk-Pawłowicz M. Changes in Human Milk Immunoglobulin Profile During Prolonged Lactation. *Front Pediatr*. 07. kolovoz 2020.;8:428.
197. Köhler H, Donarski S, Stocks B, Parret A, Edwards C, Schrotten H. Antibacterial characteristics in the feces of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. veljača 2002.;34(2):188–93.
198. Kawano A, Emori Y. The relationship between maternal postpartum psychological state and breast milk secretory immunoglobulin A level. *J Am Psychiatr Nurses Assoc*. 2015.;21(1):23–30.
199. Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, i ostali. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*. siječanj 2008.;151(1):42.
200. Akhter H, Aziz F, Ullah FR, Ahsan M, Islam SN. Immunoglobulins Content in Colostrum, Transitional and Mature Milk of Bangladeshi Mothers: Influence of Parity and Sociodemographic Characteristics. *J Mother Child*. 29. siječanj 2021.;24(3):8.
201. Hrdý J, Novotná O, Kocourková I, Prokešová L. Cytokine expression in the colostrum cells of healthy and allergic mothers. *Folia Microbiol (Praha)*. svibanj 2012.;57(3):215–9.
202. Prokešová L, Lodinová-Zádníková R, Zizka J, Kocourková I, Novotná O, Petrásková P, i ostali. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. svibanj 2006.;17(3):175–83.
203. Erbağci AB, Cekmen MB, Balat O, Balat A, Aksoy F, Tarakçioğlu M. Persistency of high proinflammatory cytokine levels from colostrum to mature milk in preeclampsia. *Clin Biochem*. kolovoz 2005.;38(8):712–6.

-
204. Laiho K, Lampi AM, Hamalainen M, Moilanen E, Piironen V, Arvola T, i ostali. Breast milk fatty acids, eicosanoids, and cytokines in mothers with and without allergic disease. *Pediatr Res. travanj* 2003.;53(4):642–7.
205. MohanKumar K, Namachivayam K, Ho TT, Torres BA, Ohls RK, Maheshwari A. Cytokines and growth factors in the developing intestine and during necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 07. studeni 2016.;41(1):52.
206. Olivares M, Albrecht S, De Palma G, Ferrer MD, Castillejo G, Schols HA, i ostali. Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur J Nutr. veljača* 2015.;54(1):119–28.
207. Kendall-Tackett K. A new paradigm for depression in new mothers: the central role of inflammation and how breastfeeding and anti-inflammatory treatments protect maternal mental health. *Int Breastfeed J.* 30. ožujak 2007.;2:6.
208. Mizuno K, Hatsuno M, Aikawa K, Takeichi H, Himi T, Kaneko A, i ostali. Mastitis is associated with IL-6 levels and milk fat globule size in breast milk. *J Hum Lact Off J Int Lact Consult Assoc. studeni* 2012.;28(4):529–34.
209. Apaydin K, Ermis B, Arasli M, Tekin I, Ankarali H. Cytokines in human milk and late-onset breast milk jaundice. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc. prosinac* 2012.;54(6):801–5.
210. Berdi M, de Lauzon-Guillain B, Forhan A, Castelli FA, Fenaille F, Charles MA, i ostali. Immune components of early breastmilk: Association with maternal factors and with reported food allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol. veljača* 2019.;30(1):107–16.
211. Zambruni M, Villalobos A, Somasunderam A, Westergaard S, Nigalye M, Turin CG, i ostali. Maternal and pregnancy-related factors affecting human milk cytokines among Peruvian mothers bearing low-birth-weight neonates. *J Reprod Immunol.* 06. travanj 2017.;120:20.
212. Coussons-Read ME, Okun ML, Schmitt MP, Giese S. Prenatal stress alters cytokine levels in a manner that may endanger human pregnancy. *Psychosom Med.* 2005.;67(4):625–31.
213. Ramiro-Cortijo D, Herranz Carrillo G, Singh P, Rebollo-Hernanz M, Rodríguez-Rodríguez P, Ruvira S, i ostali. Maternal and Neonatal Factors Modulating Breast Milk Cytokines in the First Month of Lactation. *Antioxidants. svibanj* 2023.;12(5):996.
214. Saito S, Maruyama M, Kato Y, Moriyama I, Ichijo M. Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. *J Reprod Immunol [Internet].* 1991.;20. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(91\)90051-Q](https://doi.org/10.1016/0165-0378(91)90051-Q)
215. Demers-Mathieu V, Lavangnananda S, Medo E. Influence of Vitamin D3 Levels and T Cell-Related Cytokines in Human Milk on Coronavirus Disease 2019 Infection in Lactating Women. *Breastfeed Med. prosinac* 2021.;16(12):995–1003.

-
216. Bryan DL, Forsyth KD, Gibson RA, Hawkes JS. Interleukin-2 in human milk: A potential modulator of lymphocyte development in the breastfed infant. *Cytokine*. 07. ožujak 2006.;33(5):289–93.
217. Twigger AJ, Küffer GK, Geddes DT, Filgueria L. Expression of Granulysin, Perforin and Granzymes in Human Milk over Lactation and in the Case of Maternal Infection. *Nutrients*. 04. rujan 2018.;10(9):1230.
218. Zheng Y, Corrêa-Silva S, de Souza EC, Maria Rodrigues R, da Fonseca FAM, Gilio AE, i ostali. Macrophage profile and homing into breast milk in response to ongoing respiratory infections in the nursing infant. *Cytokine*. svibanj 2020.;129:155045.
219. Amoudruz P, Holmlund U, Schollin J, Sverremark-Ekström E, Montgomery SM. Maternal country of birth and previous pregnancies are associated with breast milk characteristics. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. veljača 2009.;20(1):19–29.
220. Gadzała-Kopciuch R, Kuźniewska-Radke A, Railean V, Pomastowski P, Bernatowicz-Łojko U, Sinkiewicz-Darol E, i ostali. An analysis of IL-8, IL-6, TNF- α cytokines in breast milk and the relationship between milk nutrients and clinical diagnosis. *J Food Compos Anal*. 01. rujan 2023.;124:105731.
221. Ferrari DV de J, Polettini J, Moraes LL de, Campos LA de, Silva MG da, Saeki EK, i ostali. Profile of pro-inflammatory cytokines in colostrum of nursing mothers at the extremes of reproductive age. *PLOS ONE*. lip 2020.;15(6):e0231882.

11. Životopis**Dragica Pavlović, mag.med.techn.**

25. rujna 1980 u Gradačac (BiH)

Dom zdravlja Osječko-baranjske županije

Ledine 12, 31 000 Osijek

Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

Tel.: 099 815 47 60

Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo

E-mail: dragica.pavlovic.osk@gmail.com

Obrazovanje:

2013. - Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo

2010. – 2013. godine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni diplomski studij Sestrinstva u Osijeku

2003. – 2006. godine Zdravstveno veleučilište Zagreb, Studij sestrinstva

1995. – 1999. godine srednja Medicinska škola u Osijeku, smjer medicinska sestra/medicinski tehničar opće njege

Akademski naziv:

2013. - Magistra sestrinstva

2010. - Sveučilišni prvostupnik sestrinstva

2003. - Prvostupnik sestrinstva

1999 - Medicinska sestra/ medicinski tehničar opće njege

Nagrade:

2015. - Dobitnica Dekanove nagrade na Danima doktoranada

Članstva i aktivnosti u znanstvenim i stručnim udrugama:

2024. - Član Povjerenstva za unaprjeđenje primarne zdravstvene zaštite Ministarstva zdravstva

Od 2004. godine član Hrvatske komore medicinskih sestara (HKMS)

Od 2010. godine član Hrvatske udruge medicinskih sestara (HUMS)

Od 2010. godine član Hrvatskog društva patronažnih sestara (HDPS)

Od 2015. član Hrvatske udruge patronažnih sestara (HUPS)

2015. – 2023. - Član Povjerenstva za primarnu zdravstvenu zaštitu HKMS

2008. – 2012. Delegat Skupštine HKMS-a (Hrvatske komore medicinskih sestara)

Profesionalna karijera:

Rujan 2020. godine - Pomoćnik ravnatelja za sestrinstvo-glavna sestra u Domu zdravlja Osiječko-baranjske županije

Lipanj 2021.g. - Predavač na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo, Katedra za sestrinstvo i palijativnu medicinu, 20% radnog vremena, predavač na predmetu Zdravstvena njega u zajednici i Promocija zdravlja i primarna zdravstvena zaštita

Rujan 2018. godine - kolovoz 2020.g. Pomoćnik ravnatelja za sestrinstvo-glavna sestra u Domu zdravlja Osijek

Rujan 2015. - 2018.g. Dom zdravlja Osijek, Patronažna služba- Voditelj patronažne službe.

Lipanj 2015.-2021. suradničko zvanje asistenta, radno mjesto asistenta na određeno vrijeme za 20% radnog vremena iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvene grane sestrinstvo, suradnik za predmete Zdravstvena njega u zajednici, Organizacija rada u primarnoj zdravstvenoj zaštiti i Zdravstveni odgoj

Od 2006. - 2015. godine vanjski suradnik - mentor na vježbama nastavnih predmeta Zdravstvena njega u zajednici i Zdravstvena njega gerijatrijskih bolesnika na Stručnom studiju sestrinstva u Osijeku

Od 2004. - 2015. Dom zdravlja Osijek, Patronažna služba- Patronažna sestra

2003. – 2004. Pripravnik, Opća bolnica „ dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod

Aktivnosti i stručna usavršavanja:

1. Pavlović D. Koordinator palijativnog tima. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije, „Osnove palijativne skrbi“, predavač, Osijek; 5.-6.4, i 12.-13.04.2024.
2. Pavlović D. Zdravstveni odgoj trudnica o oralnom zdravlju. Tečaj stručnog usavršavanja Na desnoj obali Drave. Osijek; 06.04.2024.
3. Pavlović D. Pristup pretilom bolesniku u Primarnoj zdravstvenoj zaštiti, Poslijediplomski tečaj debljina. Osijek; 1.12.2023.
4. Schmidt S, Anić D, Pavlović D. Rad palijativne skrbi Doma zdravlja Osječko-baranjske županije. Međunarodni simpozij Palijativne skrbi. Našice; 31.08-1.09.2023.
5. Vinković N, Granoša A, Majić A , Pavlović D, Steiner J, Salha T. Odjel palijativne skrbi u Domu zdravlja Osječko-baranjske županije. 5. Konferencija o Palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem: „Inegrirana opća i specijalistička palijativna skrb“, sažetak. Pula; 30.9.-2.10.2022.g.
6. Majić A ,Vinković N, Granoša A, Pavlović D. Palliative care department in Osijek-Baranja Sounty Health Center. Nightingale Challenge webinar Pain Management. 3.10.2022.
7. Pavlović D. COVID-19 – protokoli u ordinacijama dentalne medicine. Tečaj stručnog usavršavanja Na desnoj obali Drave. Osijek; 10.04.2021. predavanje
8. Pavlović D. Suvremeni pristup u zbrinjavanju kronične rane izvan zdravstvene ustanove .Tečaj trajnog usavršavanja: Multidisciplinarni i polivalentni pristup u liječenju kroničnih rana.-predavanje. Osijek; 31.1.2020.

9. Pavlović D. Program promicanja dojenja u Osječko-baranjskoj županiji- Poslijediplomski tečaj I kategorije - Tečaj za zdravstvene djelatnike o promicanju dojenja: Savjetovališta za djecu-prijatelj dojenja. Osijek 27.-28.10.2023. predavač
10. Pavlović D, Mikšić Š, Debeljak P. Promicanje dojenja na području Osječko-baranjske županije. XXXIII. Perinatalni dani „Ante Dražančić“. Osijek; 11.-13.10.2019. 121-122 sažetak i predavač
11. Šimić F, Mikšić Š, Juranić B, Pavlović D. Znanje studenata sestrinstva o kroničnim ranama. 10. Pomurski simpozij o kronični rani in 6. Mednarodni. Izzivi na podričju oskrbe bolnikov s konično rano. Slovenija, Radenci; 18.10 2019.
12. Pavlović D, Kalendar cijepljenja u Republici Hrvatskoj. Seminar za zdravstvene djelatnike - edukacija edukatora o cijepljenju. Osijek; 6.9.2019g.- predavač
13. Mikšić Š, Juranić B, Pavlović D. Suvremeni pristup u zbrinjavanju dekubitalne rane u patronaži. Pomurski simpozij o kronični rani in 5. mednarodni: Dejavniki tveganja za nastanek kroničnih ran. 26.oktober 2018. Predavač
14. Dumančić D, Mikšić Š, Pavlović D. Samoučinkovitost dojenja i skrb patronažne sestre. XIII. Kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva i XII. Pedijatrijskog društva Hrvatske udruge medicinskih sestara. Šibenik; 11.-14.listopada 2018.
15. Klasić Jovanović S, Pavlović D, Kovač Z. Podržimo dojenje i pridonesimo zdravlju budućih generacija. Simpozij društva patronažnih sestara HUMS-a. Osijek; 14.rujna 2018.
16. Juranić B, Mikšić Š, Pavlović D. Intervencije medicinske sestre kod liječenja dekubitalne rane-tirchom. Pomurski simpozij o kronični rani in 4. mednarodni: Kronična rana in izzivi prohodnosti. Slovenija, Radenci; 27.10.2017.
17. Pavlović D, Mikšić Š, Juranić B. Uloga medicinske sestre kod akutnih upala mokraćnog sustava djece. Simpozij 12. osječki urološki dani i 5. osječki nefrološki dani i 4. sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije. Osijek; 11. - 13.svibnja.2017. predavač

18. Pavlović D, Mihalj M. Dojenje, prvi korak prema zdravlju. Simpozij Primarna i sekundarna prevencija bolesti suvremenog čovjeka, MF. Osijek; 21.-22.10.2016. predavač
19. Mikšić Š, Juranić B, Pavlović D, Rakošec Ž. Uloga medicinskih sestara u pružanju duhovne skrbi. 12. Simpozij društva patronažnih sestara HUMS-a. Karlovac; 23.-24.09.2016.
20. Pavlović D, Iskustva patronažne sestre u zajednici s psihičkim bolesnikom. Program stalnog medicinskog usavršavanja III.kategorije Psihijatrija i obiteljska medicina, predavač. Osijek; 04.06.20216.
21. Pavlović D, Kovač Z, Voloder V. Značaj promicanja dojenja u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. 7. Kongres Koordinacije hrvatske obiteljske medicine. Šibenik; 19.-22.05.2016. sažetak str.90, predavač
22. Pavlović D, Identifikacija čimbenika koji utječu na rani prekid dojenja kod prvog djeteta. 4.simpozij Hrvatske udruge patronažnih sestara. Zagreb; 4.3.2016.g., (Pozvani predavač)
23. Pavlović D, Mikšić Š, Pavlović O. Važnost i uloga dojenja kod prisilnih migracija IV. međunarodnog naučnog skupa- Migracije u XXI vijeku, uzroci i posljedice. 25. mart 2016. Bosna i Hercegovina,Brčko. sažetak zbornik radova 83-89. i predavač
24. Juranić B, Mikšić Š, Pavlović D. Suvremeni tretman kronične rane u palijativnoj skrbi. Slovenija, Moravske toplice; 16-17.10.2015g.
25. Pavlović D, Mikšić Š. Priprema roditelja i malog djeteta za polazak u vrtić. Sestrinstvo bez granica, Društvo patronažnih sestara. Opatija; 09.-11.10.2015. predavač
26. Pavlović D. Učinak dodatka omega tri masnih kiselina i vitamina A u prehrani dojilja na diferencijaciju limfocita u majčinom mlijeku. Medicinski fakultet Osijek, Dani doktoranada. Osijek; 27-28.svibanj.2015. – Dekanova nagrada
27. Mikšić Š, Konjarik Z, Juranić B, Pavlović D. Granulom kao komplikacija BCG cjepiva, X. Simpozij društva patronažnih sestara HUMS-a. Osijek; 15.svibanj 2015.

28. Pavlović D, Pavlović O, Mikšić D. Palijativna skrb bolesnika s Alzheimerovom demencijom. 2. Simpozij o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem. Slavonski Brod; 17.-18. 04.2015., predavač
29. Pavlović D, Mikšić Š, Sikora M. Psihosocijalne intervencije patronažne sestre stradalima u poplavama. Katastrofe prevencija i saniranje posljedica. Zbornik radova sa III. međunarodnog naučnog skupa. Brčko; 27.03.2015.predavač i sažetak
30. Pavlović D. Čimbenici koji utječu na duljinu dojenja prvog djeteta. XI. Kongres Hrvatskog Pedijatrijskog društva s međunarodnim sudjelovanjem. Paediatr. Croat. 2014; 58 suppl.(2): 79-80. Dubrovnik; 16.-19.11.2014. Sažetak i predavač
31. Pavlović D. Grupe za potporu dojenju. UNICEF - Edukacija za predavače na trudničkim tečajevima. Osijek; rujan 2014. Predavač
32. Pavlović D, Pavlović O, Sladić Rimac D, Voloder V. Prikaz znanja pacijenata o hipertenziji i njihova motiviranost za učenje. IX. Simpozij društva patronažnih sestara HUMS-a; Zdravstvena njega u zajednici. Zagreb; 6.5. 2014. Predavač
33. Sladić Rimac D, Kanisek S, Pavlović D, Armbrust Z. Sekundarna prevencija nakon dijagnosticiranja osteoporoze. IX. Simpozij društva patronažnih sestara HUMS-a; Zdravstvena njega u zajednici. Zagreb; 6.5.2014. Sažetak
34. Pavlović D, Đeri K. Promocija zdravlja preko grupa za potporu dojenja grada Osijeka. VIII. simpozij patronažnih sestara. HUMS. Promocija zdravlja u zajednici. Zagreb; 17.05.2013. predavač
35. Pavlović D, Mikšić Š. Dojenjem do zdrave budućnosti. VII. simpozij patronažnih sestara. HUMS. Primarna, sekundarna i tercijarna prevencija u patronažnoj zdravstvenoj skrbi. Opatija;18.-19.5.2012. predavač.

Objavljeni radovi:

1. Čatipović M, Mikšić Š, Fureš R, Puharić Z, Pavlović D. Deficiencies in the Intentions, Attitudes, and Knowledge of Future Healthcare Professionals Regarding Breastfeeding. Child Basel Switz. 21. srpanj 2023.;10(7):1256.

2. Blažinkov Ž, Krištofić I, Jandrić I, Blažinkov M, Lovrić B, Pavlović D, i ostali. The reliability of urodynamic assessment in confirmation of stress urinary incontinence in relation to bonney test. *Acta Clin Croat.* 2023.;62, (Suppl.2):9–13.
3. Pačarić S, Orkić Ž, Babić M, Farčić N, Milostić-Srb A, Lovrić R, I Barać I, Mikšić Š, Vujanić J, Turk T, Gvozdanović Z, Pavlović D, Srb N, Pačarić I .Impact of Immediate and Delayed Breast Reconstruction on Quality of Life of Breast Cancer Patients. *Int J Environ Res Public Health.* 13. srpanj 2022.;19(14):8546.
4. Čebihin M, Pavlović D, Smolić R, Hnatešen D, Farčić N, Marjanović K. Croatian Registered Nurses - Perception of Barriers to Research Utilization: A Cross-sectional Study. *Open Access Maced J Med Sci.* 2021.;9:28–33.
5. Miksic S, Konjarik Z, Kralj-Vasilj M, Juranić B, Pavlović D. Interventions of Health Visitors in Making a Decision About Breastfeeding. *Southeast Eur Med J.* 26. svibanj 2017.;1(1):130–5.

Aktivnost u znanstvenim projektima:

Institucijski znanstveno-istraživački projekt Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo : FDMZ-IP-2022 (PI Martina Mihalj) pod nazivom „Provođenje preventivnih mjera Zdravstvene njege u zajednici u simulacijskom kabinetu – dojenje“ Voditelj projekta Robert Lovrić ; suradnici Štefica Mikšić, Jasenka Vujanić, Dragica Pavlović, Željka Dujmić, Marija Barišić.

Tečajevi trajne edukacije:

2021. - Stručno usavršavanje za nastavnike/ mentore „Planiranje, pripremanje i priprema za nastavu u kliničkom okruženju“. FDMZ. 29.09.2021.

2019. - Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije Osnove palijativne medicine, Medicinski fakultet Zagreb. 15.-24.03.2019

2016. - Međunarodni tečaj I.kategorije Temeljne vještine edukatora u biomedicini iz zdravstvu, te interdisciplinarnim područjima znanosti, MFO 7-10.12.2016.

2015-Poslijediplomski tečaj I.kategorije Suvremena saznanja o laktaciji i dojenju, Split 21.-24.10, 18.-21.11.2015.

Ocjenski radovi-diplomski rad:

Dragica Pavlović. Identifikacija čimbenika koji utječu na rani prekid dojenja kod prvog djeteta. 2013, Medicinski fakultet Osijek.

Posebna znanja i vještine:

- Poznavanje rada u Microsoft Office programima
- Položen vozački ispit – B kategorija
- Poznavanje njemačkog i engleskog jezika 2004.(”Lanico”, završen 4. stupnj engleskog jezika)

Ostale aktivnosti:

2024. – Predsjednica Tima za palijativnu skrb Osječko-baranjske županije

2023. – Predsjednica Povjerenstva za primarnu zdravstvenu zaštitu HKMS

2023. –Poslijediplomski tečaj I kategorije - Tečaj za zdravstvene djelatnike o promicanju dojenja: Savjetovališta za djecu-prijatelj dojenja. Osijek 27.-28.10.2023.- voditelj

2022. – Član Povjerenstva za zaštitu prava pacijenata na području Osječko-baranjske županije

2018 – Konferencija Edukacija edukatora o promicanju dojenje- organizator i voditelj , Osijek 27.11.2018g.

2016. – Voditelj Tim-a za provođenje programa Promicanja dojenja u Osječko-baranjskoj županiji

12. Prilozi

Prilog 1. Obavijest za bolesnika/ispitanika u istraživanju

Prilog 2. Obrazac informiranog pristanka ispitanika o sudjelovanju u istraživanju

Prilog 3. Anketni upitnik kod prvog uzorkovanja

Prilog 4. Anketni upitnik kod drugog uzorkovanja

Prilog 1. Obavijest za bolesnika/ispitanika u istraživanju**OBAVIJEST ZA BOLESNIKA / ISPITANIKU U ISTRAŽIVANJU**

„Promjene staničnog i citokinskog sastava majčinog mlijeka tijekom akutne infekcije

dojenčeta - uloga gama delta ($\gamma\delta$) T limfocita,,

Zamoljeni ste za sudjelovanje u istraživanju koje proučava promjene u sastavu majčinog mlijeka kao odgovor na akutnu infekciju dojenčeta, s posebnim ciljem utvrđivanja uloge specifičnih imunoloških stanica ($\gamma\delta$ T limfocita) i imunoloških medijatora (citokina, imunoglobulina). Ova obavijest će Vam pružiti podatke čija je svrha pomoći Vam odlučiti želite li sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju. Prije nego što odlučite, želimo da shvatite zašto se to istraživanje provodi i što ono uključuje. Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest. Ukoliko u ovoj obavijesti ne razumijete neke riječi, slobodno pitajte liječnike i/ili istraživače koji sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju. Ovo istraživanje provode Dragica Pavlović, mag. med. techn., Izv. prof. dr. sc. Martina mihalj, dr. med. I Izv.prof. dr. sc. Stana Tokić, mag. mol. biol.

Cilj ovog istraživanja je odrediti sastav imunoloških/obrambenih komponenti majčinog mlijeka tijekom akutne infekcije dojenčeta.

Na uzorku neće pisati Vaše ime, već šifra koja omogućava potpunu zaštitu Vaših osobnih podataka/Vaše privatnosti tijekom istraživanja. Svi uključeni istraživači se obavezuju na potpunu zaštitu Vaših osobnih podataka te se Vaši osobni podaci neće pojavljivati niti u jednom znanstveno-istraživačkom dokumentu, niti će na bilo koji način biti dostupni ili objavljeni pod Vašim imenom.

Bit ćete obaviješteni o svim važnim novim informacijama dobivenim za vrijeme istraživanja, akoje mogu utjecati na Vašu spremnost za nastavak sudjelovanja u ovom istraživanju.

Metode kojima će se služiti u provođenju istraživanja su sljedeće:

1. Klinički pregled (anamnestički podatci, fizikalni status, endoskopski pregled)
2. Određivanje laboratorijskih parametara (hematoloških, biokemijskih i upalnih) iz venske krvi uzete na standardni način
3. Analiza sedimenta urina
4. Uzorkovanje mlijeka za analizu staničnog, citokinskog i imunoglobulinskog profila.

Liječenje Vašeg djeteta će se provoditi od strane nadležnog liječnika u Domu zdravlja Osječko –baranjske županije i/ili Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek te

ni u čemu neće odstupati od uobičajenoga liječenja. Možda nećete imati osobne koristi od sudjelovanja u ovom istraživanju; međutim, spoznaje koje će se steći u okviru ovog istraživanja mogu značajno unaprijediti razumijevanje čimbenika koji sudjeluju u razvoju ove bolesti te doprinijeti ciljanom i uspješnijem liječenju iste.

Ako odlučite sudjelovati dobit će te na potpis ovu obavijest (jedan primjerak zadržite). Vaša odluka o sudjelovanju u ovom istraživanju je dobrovoljna i možete se slobodno i bez ikakvih posljedica povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga. Pri tome nećete biti kažnjeni, niti ćete izgubiti pravo na optimalno liječenje Vaše bolesti. Nastavit će te se dalje liječiti na način koji je uobičajen za Vašu bolest.

Ako odlučite prekinuti sudjelovanje, molimo da o tome na vrijeme obavijestite glavnog istraživača i njegove suradnike.

Vaši će se osobni podaci obrađivati elektronički, a istraživač i njegovi suradnici pridržavat će se interne procedure za zaštitu osobnih podataka. U bazu podataka bit će te uneseni pomoću koda i prema inicijalima. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati istraživač i njegovi suradnici. Vaše ime nikada neće biti otkriveno. Pristup dokumentaciji mogu imati predstavnici Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta.

Rezultati ovog znanstvenog istraživanja mogu biti od praktične koristi, ali i znanstvene, stoga će se objavljivati u znanstvenim publikacijama, ali Vaš identitet će uvijek ostati anonimn.

Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku te Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek, nakon uvida u potpunu dokumentaciju. Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama za etičnost u provođenju kliničkih istraživanja, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju.

Za sve dodatne podatke, slobodno se obratite glavnom istraživaču ili njegovim suradnicima:

Dragica Pavlović, mag. med. techn. - glavni istraživač

Dom zdravlja Osječko – baranjske županije

Tel: 0998154760

e-mail: dragicapavlovic.os@gmail.com

Izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med. – mentor

Zavod za dermatologiju i venerologiju KBC Osijek

Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek

e-mail: martina.mihalj@gmail.com

Izv.prof. dr. sc. Stana Tokić, mag. mol. biol.

Laboratorij za analizu DNA, Medicinski fakultet Osijek

e-mail: stokic@mefos.hr

Presliku dokumenta (potpisne stranice) koji ćete potpisati ako želite sudjelovati u istraživanju dobit ćete Vi i glavni istraživač. Originalni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati glavni istraživač.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 150/08) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

GLAVNI ISTRAŽIVAČ:

Dragica Pavlović, mag. med. techn.

Prilog 2. Obrazac informiranog pristanka ispitanika o sudjelovanju u istraživanju**OBRAZAC INFORMIRANOG PRISTANKA ISPITANIKA O SUDJELOVANJU U ISTRAŽIVANJU**

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

Potvrđujem da sam dana _____, u Osijeku pročitao/pročitala ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno. Razumijem da za potrebe istraživanja trebam dati uzorak krvi i uzorak mlijeka.

Razumijem da uvid u rezultat testiranja krvi i mlijeka imaju odgovorni pojedinci (istraživač,mentor,suradnici), članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja te članovi Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Dajem dozvolu tim pojedincima za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji-nalazima.

Potpisom ovog obrasca pristajem sudjelovati u znanstvenom istraživanju i potvrđujem da sam upoznat sa sadržajem istoga. Pristajem da moj obiteljski liječnik (odnosno član obitelji) te pedijatar bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.

ŽELIM SUDJELOVATI U ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU.

IME I PREZIME ISPITANIKA/ STARATELJA:

POTPIS:_____

IME I PREZIME (tiskanim slovima)_____

DATUM:_____

Osoba koja je vodila postupak obavijesti ispitanika i suglasnost za sudjelovanje:

POTPIS:_____

IME I PREZIME (tiskanim slovima)_____

DATUM:_____

1. Ime i prezime majke:

2. Datum i godina rođenja majke:

3. Ime i prezime djeteta:

4. Datum i godina rođenja djeteta: _____
5. Spol djeteta: M Ž
6. Apgar score: _____
7. Vrsta poroda: _____
8. Broj poroda: _____
9. Tjedan trudnoće kada je bio porod: _____
10. Duljina dojenja djeteta: _____
11. Bolujete li od neke kronične bolesti: DA NE
12. Ukoliko DA, navedite koje:

13. Uzimate li stalnu terapiju: DA NE
14. Ukoliko DA, navedite koju:

15. Jeste li pušač: DA
NE
16. Imate li znakove akutne respiratorne bolesti: DA NE
17. Ukoliko DA, navedite koje:

18. Znakovi infekcije kod djeteta (zaokružite ponuđeni odgovor-moguće više odgovora):

- a. Povišena tjelesna temperatura
- b. Razdražljivost
- c. Proljev
- d. Bljuckanje
- e. Plač
- f. Ubrzano disanje
- g. Klonulost
- h. Osip
- i. Slabo napredovanje na težini
- j. Marmorizirana koža
- k. Hladne okrajine
- l. Perioralna cijanoza
- m. Kašalj
- n. Curenje nosa

19. Je li rađena mikrobiološka obrada djeteta: DA NE

20. Ukoliko DA, zaokružite koja:

- a. Bris ždrijela
- b. Urinokultura
- c. Analiza stolice

n. Curenje nosa