

Глава 10

Исследование новорожденных мышей для выяснения функций лимфоцитов пуповинной крови человека

Cheri D. Landers • Subbarao Bondada

Восприимчивость новорожденных детей к инфекциям

Иммунный ответ организма новорожденных детей

Иммунный ответ организма новорожденных мышей

Корреляция неонатальных показателей иммунного ответа человека и мыши

Различия иммунореактивности человека и мыши

Клиническое применение данных и необходимость дальнейших исследований

Разработанные на животных модели патологий человека дают возможность проведения более контролируемых исследований *in vivo* и *in vitro* по сравнению с тем, что можно сделать непосредственно в исследованиях с участием людей. Сведение до минимума генетических различий у животных, создание трансгенных и нокаутных животных путем направленных мутаций и скрещивания, жесткий контроль условий среды и экспериментов — все это позволяет исследовать сложные синдромы и заболевания человека на различных уровнях, включая молекулярный. Животные модели используют также для изучения потенциально небезопасных терапевтических средств и методов до проведения исследований в популяциях человека. Недостатки исследований, моделирующих патофизиологию и терапию заболеваний у человека, обусловлены физиологическими различиями человека и животных, а также генетической вариабельностью у людей, не свойственной большинству изучаемых видов животных. Это означает, что экстраполяция на человека данных, полученных на животных, не всегда возможна, однако эти данные служат отправной точкой для проведения исследований с участием людей. Чаще всего для изучения физиологии и моделирования заболеваний человека используют мышей. Их легко разводить, для их содержания нужно мало места, и они имеют установленные генетические характеристики. Модели на мышах используют для изучения самых разнообразных процессов: иммунной регуляции [1], развития нервной системы и ее заболеваний

[2–5], сосудистых болезнях [6], лекарственной терапии [7, 8], механизмов заболеваний легких [9, 10], врожденных заболеваний и пороков развития [2, 11], патогенеза, этиологии и лечения опухолей [7, 12–14] и терапии инфекционных заболеваний [15, 16].

Сведения об иммунной системе человека необычайно расширились благодаря использованию животных моделей. Иммунная система человека состоит из первичных и вторичных лимфоидных органов; костный мозг служит источником образования иммунных клеток и вторичных лимфоидных органов (селезенка и другие органы), где происходит иммунный ответ. Архитектура лимфоидных органов, цитокины и хемокины играют первостепенную роль в осуществлении иммунного ответа. Нормальный ответ иммунной системы человека усиливается от неонатального периода до взрослого возраста, а затем снижается по мере старения. Такие же изменения происходят в течение жизни у мышей. Кроме того, мыши при рождении обладают наименьшей степенью зрелости среди всех млекопитающих, и им требуется около 1/15 продолжительности жизни, чтобы достичь полной иммунокомпетентности [17]. В связи с этим исследование неонатального иммунного ответа у мышей существенно расширяет знания о развитии иммунной системы у человека. В частности, иммунный ответ лимфоцитов новорожденных мышей используют как модель неонатального иммунного ответа человека и особое внимание уделяют исследованию лимфоцитов пуповинной крови [18–21]. В данной главе представлен краткий обзор восприимчивости новорожденных детей к инфекциям, описаны состояния дефицита иммунной системы новорожденных, особое внимание уделено недостаточности продукции иммуноглобулинов В-клетками в ответ на специфические антигены. Все эти сведения даны в сопоставлении с тем, что происходит в организме новорожденных мышей, а также описаны исследования, проведенные на новорожденных мышках, открывающие возможности повышения ответа неонатальных лимфоцитов на антиген.

ВОСПРИИМЧИВОСТЬ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ К ИНФЕКЦИЯМ

Новорожденные более восприимчивы к разнообразным инфекциям, чем взрослые. Это обусловлено незрелостью острого воспалительного ответа, недостаточным взаимодействием Т- и В-клеток, слабым развитием иммунологической памяти, низкой продукцией антител в слизистых оболочках и сниженным ретикулоэндотелиальным клиренсом. Все это приводит к повышению чувствительности к *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типа b, *Neisseria meningitidis*, вирусам и кандидозным инфекциям в первые 6 мес жизни [22]. Маленькие дети особенно чувствительны к инфекциям, вызываемым бактериями, имеющими полисахаридную капсулу, из-за отсутствия продукции антител в ответ на полисахаридные антигены. К такого рода бактериям относятся *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* [23, 24]. Эти микроорганизмы могут вызвать чрезвычайно тяжелые инвазивные заболевания — пневмонию, сепсис и менингит, связанные со значительным риском летального исхода. Антитела к капсульным полисахаридам данных бактерий играют первостепенную роль в элиминации этих внеклеточных микроорганизмов. Как только антитела начинают взаимодействовать с антигеном-мишенью, образование комплекса антиген–антитело

ослабляет инфекционные свойства бактерий и инициирует различные реакции, приводящие к высвобождению воспалительных медиаторов, активации комплемента, опсонизации и фагоцитозу [25].

Приблизительно до 4–6-месячного возраста иммунитет ребенка обеспечивают иммуноглобулины, полученные от матери в результате трансплацентарного переноса IgG. После элиминации этих антител ребенок с 6 мес до 2 лет жизни становится восприимчивым к опасным инфекциям, вызываемым капсульными бактериями [22, 26–28]. Позднее, в возрасте 2–5 лет, дети приобретают способность к иммунному ответу на полисахаридные антигены. Чтобы создать иммунитет к опасным заболеваниям в интервале от 6 мес до 5 лет, детям в первые 6 мес вводят вакцины против полиовирусов, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae* типа b, вируса гепатита В, *Bordetella pertussis* и *Streptococcus pneumoniae*. Эти вакцины защищают ребенка от полиомиелита, дифтерии, столбняка, гепатита, коклюша, а также от тяжелой пневмонии, сепсиса и менингита.

До начала вакцинации конъюгированным белком *H. influenzae* типа b (Hib) вызываемое Hib заболевание было наиболее частой бактериальной инфекцией у маленьких детей в индустриальных странах [29]. Степень тяжести заболевания варьировала от сравнительно легкой (средний отит) до очень тяжелой (сепсис и менингит). Новорожденные до 6-месячного возраста заболевали редко вследствие передачи материнских антител через плаценту, и пик заболеваемости приходился на период от 6- до 12-месячного возраста, когда материнские антитела исчезали, а собственные Ig ребенок еще не продуцировал [29]. Естественный иммунитет к Hib возникает в результате носоглоточной колонизации или инфекции, однако ни естественный, ни приобретенный после вакцинации чистым полисахаридом иммунитет не развивается до возраста 2 лет. Кроме того, отсутствуют развитие иммунологической памяти и вторичный ответ (продукция антител) после естественной или проведенной чистым полисахаридом вакцинации. Именно поэтому и была разработана конъюгированная белковая вакцина.

После успешной разработки вакцины против Hib самой распространенной инфекцией раннего и старшего детского возраста стало заболевание, вызываемое *S. pneumoniae*. Наиболее распространено инвазивное пневмококковое заболевание среди детей в возрасте до 2 лет, после чего частота заболеваемости снижается и постепенно вновь повышается в пожилом возрасте [30]. Недавно была разработана конъюгированная вакцина против *S. pneumoniae*, которую вводят детям.

Применяемые в настоящее время вакцины против *Haemophilus influenzae* типа b и семивалентная вакцина Prevnar® фирмы Wyeth pharmaceuticals против *S. pneumoniae* эффективны, поскольку бактериоспецифический капсульный полисахарид конъюгирован с белком, например со столбнячным анатоксином или мутантным дифтерийным токсином. Конъюгированные вакцины вызывают развитие иммунологической памяти и способность к вторичному иммунному ответу. Их применение позволило снизить частоту возникновения тяжелых Hib-инфекций и примерно на 75% уменьшить число случаев инвазивной пневмококковой инфекции, которую вызывают 7 серотипов, включенных в вакцину [31] (табл. 10–1). Однако всего существует 90 индивидуальных серотипов *S. pneumoniae*, поэтому разработка всеохватывающей вакцины была прекращена. Современная вакцина содержит только 7 наиболее распространенных и инвазивных серотипов.

ТАБЛИЦА 10–1 Полисахаридно-капсульные бактерии и доступные вакцины

Бактерии	Вакцина	Примечания
<i>Haemophilus influenzae</i>	Конъюгированная белковая	Введение с 2-месячного возраста; много доступных лицензированных вакцин с различными белками; снижение тяжелых инфекций
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Полисахаридная (23-валентная)	Неэффективна у детей раннего возраста
	Конъюгированная белковая (7-валентная)	Эффективна у детей до 2 лет; введение с 2-месячного возраста; возможно возникновение инфекций, вызываемых невакцированными серотипами
<i>Neisseria meningitidis</i>	Полисахаридная	Неэффективна у детей до 2 лет; включает типы А, С, Y и W-135 (не тип B)

Оставшиеся 83 серотипа, не включенные в конъюгированную пневмококковую вакцину, все же могут вызвать заболевание. Появились данные, что частота пневмококковых заболеваний, обусловленных невакцированными серотипами 15 и 33, возрастает [31]. Конъюгированные вакцины наглядно демонстрируют, как исследования на мышах помогли создать эффективные вакцины для новорожденных детей [32–37].

Пик заболеваемости, вызываемой третьим представителем полисахаридно-капсульных бактерий, *N. meningitidis*, приходится на возрастной интервал 6–15 мес, причем заболевание может варьировать от бессимптомного носоглоточного носительства до внезапно развивающегося шока, приводящего к смерти в считанные часы [38]. В настоящее время вакцина против *N. meningitidis*, которую можно было бы применять для иммунизации детей до 2-летнего возраста, отсутствует. Существующие вакцины используют для иммунизации подростков и взрослых (вакцины для них состоят только из капсульного полисахарида *N. meningitidis*) [39].

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ОРГАНИЗМА НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Новорожденные и дети раннего возраста более восприимчивы к инфекциям, чем взрослые, вследствие ряда факторов. И врожденный иммунитет, и адаптивный иммунитет еще недостаточно развиты, организм слабо отвечает на инвазию вирусов, бактерий или грибов. Нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки, $\gamma\delta$ -Т-клетки и В-1-клетки представляют собой основные медиаторы врожденного иммунитета, тогда как для адаптивного иммунного ответа необходимы Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и макрофаги [40].

Функции нейтрофилов

Нейтрофилы являются одним из компонентов врожденного иммунитета и характеризуются быстрым ответом, не изменяющимся при повторной встрече с тем же самым микроорганизмом. Нейтрофилы и мононуклеарные фагоциты создают первую линию защиты против бактерий, грибов и простейших. Эти клетки содержат поверхностные рецепторы для антител и комплемента, позволяющие им распознавать связанные с патогенами антитела и/или комплемент, что усиливает фагоцитоз микроорганизмов [40]. По сравнению со взрослыми у де-

тей в костном мозге еще недостаточен резервный пул нейтрофилов, мобилизуемый во время инфекции, даже если число циркулирующих в крови нейтрофилов превышает их содержание у взрослых [41]. Также снижена способность неонатальных нейтрофилов к адгезии и миграции через эндотелий в нормальных условиях и при стимуляции [42–45], уменьшены число и поверхностная экспрессия рецепторов комплемента [46–48], снижена бактерицидная активность при генерализованных инфекциях [49], недостаточна опсонизирующая активность, низок уровень показателей окислительного метаболизма, снижены хемотаксис (направленное движение клеток) [50], хемокинез (неупорядоченное движение клеток) и внутриклеточный киллинг (переваривающая способность) [51–55] нейтрофилов. Это делает новорожденного склонным к нейтропении после истощения запаса циркулирующих нейтрофилов, снижает способность к изоляции микроорганизмов и уничтожению их нейтрофилами, когда организм инвазируют патогены (табл. 10–2).

Адаптивный иммунитет

Первый контакт организма с патогеном индуцирует адаптивный иммунный ответ, называемый также первичным иммунным ответом. В нем участвуют иммунные клетки различных типов: Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и макрофаги. Адаптивный иммунный ответ подразделяют на клеточно-опосредованный (клеточный) и гуморальный. Важным отличительным признаком адаптивного иммунного ответа служит иммунологическая память, позволяющая организму отвечать быстрее и более специфично при вторичном контакте с тем же патогеном, который вызвал первичный иммунный ответ.

Иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами

Одним из компонентов адаптивного иммунитета является клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами. Его назначение — борьба с внутриклеточными микроорганизмами [56]. Т-клеточный иммунитет индуцируют хелперные Т-лимфоциты ($CD4^+$) или цитотоксические Т-лимфоциты ($CD8^+$). При стимуляции антигеном наивные Т-клетки дифференцируются в клетки двух субпопуляций, для каждой из которых характерен определенный профиль продуцируемых цитокинов. Так, Th1-клетки секретируют $IFN-\gamma$ и IL-12, Th2-клетки — IL-4 и IL-5 [40]. Th1-клетки играют главную роль в клеточном иммунитете, от которого зависит уничтожение внутриклеточных бактерий, например *Mycobacterium* spp., или паразитов, например *Leishmania*. Th2-клетки ответственны за гуморальный иммунный ответ, направленный на борьбу с инфекциями, вызываемыми внеклеточными бактериями и гельминтами. По отношению к атопическим и неатопическим антигенам Th1-ответ организма новорожденных менее выражен, чем Th2-ответ [57, 58]. Однако Th1-ответ организма новорожденных может достигнуть уровня ответа организма взрослых при определенных условиях, например в результате иммунизации вакциной БЦЖ, состоящей из *Mycobacterium bovis* [59–61]. Ответ Th2-типа преобладает, когда плод подвергается действию антигенов внешней среды *in utero* [59, 62, 63]. Аналогично активность цитотоксических Т-лимфоцитов у новорожденных может стать такой же, как у взрослых, только в определенных ситуациях, в частности в случае врожденной инфекции, вызванной цитомегаловирусом или *Trypanosoma cruzi* [64, 65] (см. табл. 10.2).

ТАБЛИЦА 10–2 Характеристики иммунитета взрослых и новорожденных

Иммунные клетки	Взрослые	Новорожденные
Нейтрофилы	Быстрый ответ Отсутствие памяти Пул в костном мозге Рецепторы комплемента и антител на клеточной поверхности Мигрируют в очаг инфекции Фагоцитоз и внутриклеточное уничтожение	Быстрый ответ Отсутствие памяти Сниженный резерв в костном мозге Уменьшение Адгезия и миграция снижены Снижение
T-клетки	Память Th1- и Th2-клетки Цитотоксические T-лимфоциты	Память Th2-ответ выше, чем Th1 Ответ цитотоксических T-лимфоцитов достигает уровня взрослых лишь при определенных условиях
B-клетки/Ig	Память Секреция антител против: TD-антигенов TI-антигенов Секреция IgM, IgG1, IgG2 и IgA Уровень IgG, свойственный взрослым	Кратковременная память Ответ замедлен, пик и аффинность ниже Недостаточный ответ IgM, IgG1, мало IgA Материнский IgG со временем деградирует, минимум IgG в возрасте 3–4 мес
Вспомогательные клетки	Секреция цитокинов Внутриклеточное уничтожение Презентация антигена	Баланс анти- и провоспалительных цитокинов Снижение Сниженное количество клеток

TD — тимус-зависимые; Th1 и Th2 — T-хелперы типов 1 и 2; TI — тимус-независимые; Ig — иммуноглобулины.

Иммунитет, опосредованный В-лимфоцитами

Другим компонентом адаптивного иммунитета является гуморальный иммунитет, опосредованный В-клетками, секретирующими специфические антитела к антигенам/микроорганизмам. Также для активного гуморального иммунного ответа нужно воздействие микроорганизма, однако в данном случае микроорганизм должен быть внеклеточным. Антитела специфически распознают микробные антигены, ослабляют их инфективность и иницируют элиминацию патогена из организма [25]. Гуморальный иммунитет может быть пассивным или активным. Пассивный иммунитет создают материнские антитела (класса IgG, но не IgM), проходящие через плаценту. Со временем эти антитела деградируют, и поскольку ребенок в это время не способен продуцировать такое же количество IgG, как взрослый, уровень IgG у него достигает минимума в возрасте 3–4 мес [66, 67].

Способность к активному гуморальному иммунному ответу развивается постепенно на протяжении первых лет жизни. Неонатальная антигенспецифическая продукция антител неполноценна в отноше-

нии некоторых типов антигенов (например, полисахаридов и липополисахаридов), и неонатальный IgG-ответ ограничен некоторыми подклассами. В ответ на полисахаридные антигены независимо от возраста образуются антитела IgG, IgA и IgM, однако дети продуцируют главным образом IgG1, а взрослые и IgG1, и IgG2 [68, 69]. Основная причина нарушенного ответа на полисахариды у детей — незрелость В-клеток. Поскольку фенотип и локализация субпопуляций В-клеток меняются с возрастом, у детей развивается способность продуцировать антитела к полисахаридным антигенам подобно взрослым [22]. Каждый подкласс Ig достигает «взрослого» уровня в различном возрасте, а к 12 годам уровень всех подклассов Ig у детей и взрослых становится одинаковым [70] (см. табл. 10.2).

В дополнение к слабому ответу на естественную инфекцию ответ организма новорожденных и маленьких детей на вакцинацию отличается от ответа организма взрослых. Часто новорожденные неспособны развивать полноценный иммунный ответ на иммунизацию чистыми полисахаридами, который эффективен у молодых взрослых индивидов [24]. Полисахаридные антигены сами по себе стимулируют тимус-независимый (ТИ) ответ, т.к. они плохо процессируются или совсем не процессируются антигенпрезентирующими клетками. Это обуславливает неспособность АПК индуцировать специфичные к полисахаридам хелперные Т-клетки. Впервые ТИ-антигенами называли такие антигены, которые были способны индуцировать иммунный ответ у бестимусных («голых») мышей [71]. Однако затем пришлось ввести более сложное определение, т.к. было обнаружено, что в действительности бестимусные мыши имеют небольшое количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [72]. Конъюгированные белковые вакцины (т.е. полисахариды *H. influenzae* и *S. pneumoniae*, связанные с белками, например столбнячным или дифтерийным токсином) стимулируют тимус-зависимый (ТД) ответ и вызывают у новорожденных более выраженный иммунитет, чем чистые полисахариды. ТД-ответ требует презентации процессированного антигена Т-клеткам молекулами ГКГС класса II. К ТД-антигенам относятся белки, вирусы, нуклеиновые кислоты и эритроциты. В отличие от ТИ-антигенов ТД-антигены способны вызвать определенный иммунный ответ организма новорожденных. Однако этот ТД-ответ развивается медленно, он менее высок и продолжителен, чем у взрослых; образующиеся антитела имеют сниженную аффинность и гетерогенность по сравнению со взрослыми и отличаются по типу подкласса IgG, причем новорожденные продуцируют меньше IgG2 [73] (см. табл. 10.2). Этот неполноценный ответ обусловлен, по крайней мере частично, неполным развитием лимфоидной ткани до 4-месячного возраста [74].

Тимус-независимый ответ не нуждается в презентации антигена молекулами ГКГС класса II, но требует участия В-клеток и макрофагов. Макрофаги служат источником цитокинов, способствующих созреванию и дифференцировке В-клеток. У новорожденных этот ТИ-ответ слабый; ТИ-антигены деградируют медленнее, чем ТД-антигены, не индуцируют иммунологическую память (или она выражена слабо) и продукцию антител, которая возникает лишь в более позднем возрасте. ТИ-ответ подразделяют на ответы ТИ-1 и ТИ-2. Примерами антигенов, вызывающих ответ ТИ-1, служат липополисахариды, убитые нагреванием бактерии *Brucella abortus*, *Neisseria meningitidis*, экстракт *Nocardia* и белки наружной мембраны. ТИ-2-антигены включают ТНР-фиколл и бактериальные полисахариды,

выделенные из *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* [75] (табл. 10–3). TI-2-антигены могут перекрестно связывать В-клеточные рецепторы, стимулируя активацию В-клеток. Хотя ответ TI-2 не требует презентации антигенов молекулами ГКГС класса II, он зависит от антигеннеспецифических Т-клеток и/или цитокинов, продуцируемых Т-клетками и вспомогательными клетками [76, 77].

Возможными причинами неспособности новорожденных детей отвечать на TI-2-антигены, например полисахариды, являются незрелость В-клеточной популяции [78], дефицит субпопуляций В-клеток, отвечающих на TI-2-антигены [75], повышенная чувствительность неонатальных В-клеток к индукции толерантности [79], неадекватный баланс Т-клеток-супрессоров и Т-клеток-амплификаторов [80] и дефекты вспомогательных клеток, в том числе неадекватная продукция стимулирующих цитокинов и избыточное образование ингибирующих цитокинов [81].

Одновременно с появлением способности маленьких детей отвечать на полисахаридные антигены происходят изменения фенотипа и локализации субпопуляций В-клеток. Неонатальные В-клетки экспрессируют IgM и IgD также, как IgG или IgA, указывая на неполное переключение изотипа тяжелых цепей в этом возрасте [78]. Кроме того, неонатальные В-клетки относятся преимущественно к CD5⁺ (маркер субпопуляции В-клеток, развивающейся на ранней стадии онтогенеза), а с возрастом становятся преимущественно CD5⁻ [40, 82–85]. Неонатальные В-клетки имеют меньше рецепторов цитокинов IL-2 (вместе с IL-4 стимулируют пролиферацию активированных В-клеток), IL-4, IL-6 (стимулируют созревание В-клеток в плазматические клетки и продукцию антител) и IL-7 (стимулируют пролифера-

ТАБЛИЦА 10–3 Характеристики тимус-независимого и тимус-зависимого иммунных ответов

	Тимус-независимый иммунный ответ		Тимус-зависимый иммунный ответ
	TI-1	TI-2	
Необходимость презентации молекулами ГКГС класса II	Нет	Нет	Да
Необходимость в В-клетках и макрофагах	Да	Да	Нет
Новорожденные	Слабый ответ	Слабый ответ	Адекватный ответ
Деградация антигена	Медленная	Медленная	Быстрая
Память	Отсутствует или слабая	Отсутствует или слабая	Да
Примеры антигенов	Липополисахариды <i>Brucella abortus</i> Экстракт <i>Nocardia meningitidis</i> — убитые нагреванием бактерии и белок наружной мембраны	TNP-фиколл Бактериальные полисахариды	Белки Вирусы Липопроотеины Эритроциты

цию незрелых В-клеток) и обладают сниженной способностью повышать экспрессию рецептора IL-2 при стимуляции [86–88].

Селезенка играет важную роль в В-клеточном иммунитете; у пациентов с функциональной или хирургической спленэктомией повышена восприимчивость к инфекциям, вызываемым полисахаридно-капсульными бактериями [89]. Рецептор компонента комплемента C3 (CD21) является маркером зрелых В-клеток; В-клетки, присутствующие в краевой зоне селезенки, экспрессируют CD21 на высоком уровне. CD21 представляет собой рецептор комплемента, связывающий продукты расщепления C3b и образующий комплекс с двумя другими рецепторами [90]. Одновременное связывание В-клеточного рецептора и CD21 усиливает В-клеточный ответ и снижает порог стимуляции В-клеток на несколько порядков. Связывание В-клеточных рецепторов с микроорганизмами, на которых отложен компонент C3b, усиливает их ответ [91]. В селезенке новорожденных В-клетки CD21⁺ краевой зоны отсутствуют. Кроме того, селезенка представляет собой источник В-клеток IgM-памяти, которые оказываются клеточной популяцией, ответственной за продукцию антител к полисахаридным антигенам. У детей до 2 лет В-клетки IgM-памяти отсутствуют. Со временем эта популяция появляется в циркулирующей крови, и ребенок становится способным отвечать на полисахаридные антигены [92].

Функции вспомогательных клеток (макрофаги/моноциты и дендритные клетки)

Некоторые функции макрофагов/моноцитов у детей также еще несовершенны. Макрофаги у детей хуже отвечают на хемотаксические факторы сыворотки, не способны эффективно функционировать вследствие сниженной опсонической активности и более чувствительны к метаболическому стрессу, т.к. обладают уменьшенной пируваткиназной активностью и содержат меньше АТФ [93, 94]. Макрофаги продуцируют сниженное количество Г-КСФ, что способствует развитию нейтропении в условиях стресса, сниженное количество IL-6 и при воздействии IFN- γ активируются слабее [95–98].

Дендритные клетки представляют собой антигенпрезентирующие клетки, инициирующие иммунный ответ наивных Т-клеток или индуцирующие толерантность к аутоантигенам. Дендритные клетки образуются из клеток моноцитарной линии в присутствии ГМ-КСФ и/или IL-4 и выполняют функцию «клеток-часовых», расположенных в местах наиболее вероятной микробной инвазии, захватывающих антиген и презентующих его наивным хелперным Т-клеткам [99]. Стимулированные дендритные клетки или мононуклеарные клетки пуповинной крови продуцируют сниженный уровень IL-12p70 и IL-12p35 (субъединицы стимулирующего цитокина IL-12) по сравнению со взрослыми [100–105]. Образующиеся из моноцитов макрофаги и плазмоцитоидные дендритные клетки новорожденных отвечают сниженной активацией и продукцией цитокинов при стимуляции IFN- γ или CpG-ДНК (см. далее) [106, 107] (см. табл. 10.2).

Продукция цитокинов

Цитокины представляют собой растворимые медиаторы, продуцируемые главным образом иммунными, но также неиммунными клетками. Цитокины оказывают выраженное влияние на функции Т-клеток, В-клеток, ДК, макрофагов и некоторых неиммунных клеток. Суще-

ствуют противоречивые данные, касающиеся количества цитокинов, образуемых неонатальными иммунными клетками. В большинстве исследований показано, что моноциты пуповинной крови продуцируют меньше TNF- α , чем моноциты взрослых индивидов [108–112]. В одной из работ было установлено, что неонатальные моноциты человека продуцируют меньшее количество IL-1, чем взрослые моноциты при ЛПС-стимуляции [110]. В других работах не найдено различий в образовании IL-1 моноцитами после стимуляции ЛПС или IFN- γ [108, 109, 111, 113]. Существуют также противоречивые данные о продукции IL-6 неонатальными моноцитами человека. Некоторые авторы выявили дефицит продукции IL-6 по сравнению со взрослыми клетками [96, 98, 108], другие различий не обнаружили [109, 114, 115], а третьи описали повышенную продукцию IL-6 мононуклеарными клетками пуповинной крови как на базовом уровне [116], так и в ответ на стимуляцию [116–118]. Мононуклеарные клетки пуповинной крови и мононуклеарные клетки периферической крови новорожденных после стимуляции образуют меньше IFN- γ , чем взрослые РВМС [119, 120]. В одной из работ определяли уровень продукции IL-8 в пуповинной крови и крови новорожденных и сравнивали с уровнем IL-8 у взрослых. При стимуляции ЛПС образование IL-8 было выше в пуповинной крови, чем в крови взрослых; базовый уровень IL-8 также был выше в пуповинной крови после инкубации в отсутствие стимулов [118]. В одном исследовании было установлено, что уровень мРНК и внутрицитоплазматическая продукция противовоспалительного цитокина IL-10 были менее выражены в пуповинной крови, чем в крови взрослых, после ЛПС-стимуляции [121], тогда как в другом исследовании был определен сходный уровень продукции в различных возрастных группах, когда клетки инкубировали вместе с грамположительными и грамотрицательными бактериями [117]. Возможные причины противоречивости результатов в этих исследованиях, проведенных с участием людей, могут заключаться в том, что использовали различные клеточные популяции (периферическую цельную кровь, мононуклеарные клетки или макрофаги/моноциты), различные стимулы (ЛПС, фитогемагглютинин, бактерии), методы определения (мРНК, внутриклеточное содержимое, супернатант и т.д.), а число доноров было ограниченным.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ОРГАНИЗМА НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ

У новорожденных мышей, как и у человека, иммунокомпетентность снижена и возрастает со временем, пока мыши не станут взрослыми. В связи с этим разработанные на мышах модели позволяют дать ответы на ряд вопросов, относящихся к особенностям иммунного ответа новорожденных детей. Популяции иммунных клеток для исследования обычно получают из селезенки, лимфоузлов, тимуса, легких и брюшной полости мышей, а не из периферической крови, поскольку, как указано ранее, с кровью связаны некоторые различия, выявляемые при экстраполяции на человека данных, полученных в экспериментах на мышах.

Иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами

Количество Т-клеток у новорожденных мышей снижено по сравнению со взрослыми животными на 1–2 логарифма, возможно

обуславливая ограниченный защитный ответ после воздействия антигена; однако субпопуляция неонатальных клеток мыши способна пролиферировать [122]. CD4⁺ Т-клетки новорожденных мышей происходят как из фетальных, так и из взрослых гемопоэтических клеток-предшественников. После иммунизации Т-клетки фетального происхождения дают преимущественно Th2-ответ при повторном воздействии иммунизирующего антигена [123]. Т-клетки фетального происхождения присутствуют также у человека, и действие антигенов среды *in utero* вызывает в большей степени Th2-ответ [57, 59, 62, 63]. В ранних исследованиях было установлено, что неонатальные Т-клетки особенно склонны к развитию толерантности, определяемой в модели трансплантации. Недавние исследования показали, что это обусловлено дисбалансом соотношения Т-клеток и дендритных клеток [124], а также может быть связано с отсутствием регуляторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [59]. У новорожденных мышей можно индуцировать Т-клеточный ответ, сопоставимый по уровню с ответом взрослых животных, при создании определенных условий, в частности в присутствии адекватного количества дендритных клеток [59, 124]. Ответ неонатальных Т-клеток сдвинут в сторону образования Th2-клеток, однако он может быть превращен в ответ Th1-клеток, если действие антигена сочетается с агентами, способствующими Th1-ответу, такими как ДНК-вакцины или олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG. Th2-сдвиг у новорожденных мышей не столь выражен, как у новорожденных детей, а в некоторых ситуациях, например при малярийной инфекции [125], у новорожденных детей снижен как Th1-, так и Th2-ответ. Происхождение или локализация неонатальных Т-клеток могут способствовать ответу, вызываемому инфекцией. Так, неонатальные клетки лимфоузлов мышей остаются дефицитными по Th1-ответу при трансплантации взрослым мышам, тогда как неонатальные клетки селезенки способны выполнять функции зрелых Th1-клеток и устранять инфекции, вызванные *Pneumocystis carinii*, при переносе взрослым мышам [126, 127]. Неонатальные цитотоксические Т-лимфоциты дают сильный первичный ответ и/или развитие иммунологической памяти при действии сильных стимулирующих Th1-ответ агентов, указанных ранее [59]. Недавно было обнаружено, что функция цитотоксических CD8⁺ Т-клеток у новорожденных сравнима с таковой у взрослых индивидов (как у мышей, так и у человека), особенно если исследование проводят в короткий период времени после иммунизации [59].

Иммунитет, опосредованный В-лимфоцитами

У новорожденных мышей, как и у новорожденных детей, TD- и TI-ответы менее выражены по сравнению со взрослыми особями. Были обнаружены фенотипические различия у новорожденных мышей, у которых незрелые В-клетки IgM⁺/IgD^{low/-} преобладали в популяции В-клеток селезенки. Незрелые В-клетки генерируют отрицательные сигналы, когда их В-клеточный рецептор связывается с лигандом; они не повышают экспрессию костимулирующих молекул или молекул ГКГС класса II, дающих возможность взаимодействия с Т-клетками при TD-ответе [128–130]. Концепция TI-ответа была создана в результате обширных исследований на мышах, в частности на «голых» с врожденным отсутствием тимуса. В последующих работах с использованием современных методов разделения клеток было установле-

но, что высокоочищенные В-клетки, полученные у взрослых мышей, способны отвечать на ТИ-антигены при полном отсутствии Т-клеток. Однако на ответ В-клеток на ТИ-антигены оказывают существенное влияние вспомогательные клетки или цитокины, полученные из Т-лимфоцитов или вспомогательных клеток. Исследования *in vivo* на трансгенных мышах, несущих В-клеточные рецепторы, показали, что ТИ-ответ осуществляется в первую очередь В-клетками краевой зоны селезенки с участием дендритных клеток крови и перитонеальных В-1-клеток [131, 132]. Данные, полученные в результате исследования на мышах, свидетельствуют о том, что для развития В-1-клеток, которые играют определенную роль в продукции антител к полисахаридам, нужно наличие селезенки [133]. Как и человек, мыши при рождении имеют малое количество В-клеток краевой зоны, и появление этих В-клеток в более поздний период жизни соответствует возникновению способности отвечать на ТИ-антигены [134].

Недавно было показано, что бактериальная ДНК, которую раньше считали иммунологически инертной, способна вызывать стимулирующий иммунный ответ [135, 136]. Бактериальная ДНК отличается от ДНК млекопитающих повышенным содержанием динуклеотидных последовательностей CpG и меньшим числом CpG-нуклеотидов, метилированных у бактерий [137]. Эти различия создают основу для распознавания чужеродной ДНК млекопитающими, способными к иммунному ответу на бактерии. У неонатальных мышей стимуляция посредством CpG-ОДН, а не только перекрестное связывание В-клеточных рецепторов может индуцировать пролиферацию В-клеток. Далее, стимуляция CpG-ОДН может превзойти ареактивность неонатальных мышинных В-клеток по отношению к сигналам, генерируемым В-клеточным рецептором, т.к. низкие концентрации CpG и анти-IgM могут индуцировать сильный В-клеточный пролиферативный ответ. Нормальные неонатальные В-клетки в ответ на лигирование В-клеточного рецептора подвергаются апоптозу, а CpG-ОДН препятствуют этому процессу. Кроме того, CpG-ОДН стимулируют продукцию неонатальными В-клетками мышей поликлональных IgM в количестве, сопоставимом с количеством IgM, образуемых В-клетками взрослых мышей [81, 138].

Цитокины, необходимые для иммунного ответа организма новорожденных мышей

При исследовании ответа неонатальных В-клеток на TNP-фиколл или TNP-ЛПС как модельные ТИ-антигены было обнаружено, что высокоочищенные неонатальные В-клетки хорошо отвечают на эти стимулы лишь в присутствии цитокинов IL-1 и IL-6 [139]. В этой системе неонатальный ответ был сопоставим с ответом взрослых клеток. Для оптимального ответа необходимо присутствие обоих цитокинов. Авидность ответа, индуцированного TNP-фиколлом в присутствии цитокинов, была сходной у новорожденных и взрослых мышей [139]. Цитокины IL-4 и IL-5 были эффективны, когда в качестве ТИ-стимула использовали декстран, связанный с антителами к В-клеточному рецептору [140]. В этой системе ответ неонатальных В-клеток требовал также стимуляции через лиганд CD40. В обеих системах только одни неонатальные В-клетки не отвечали на ТИ-антиген. Исследования *in vivo* выявили, что цитокин IL-12 также способен усиливать ответ организма новорожденных мышей на полисахарид [141].

Эти исследования показали, что присущее неонатальным В-клеткам нарушение ответа на полисахаридные антигены может быть скорригировано с помощью соответствующей комбинации сигналов, посылаемых цитокинами и CD40. Кинетические исследования выявили, что цитокины необходимо добавить во время ранней фазы В-клеточной активации. Они способны преодолеть нарушения индуцированной через В-клеточный рецептор пролиферации неонатальных В-клеток, а также индуцированной антигеном дифференцировки [139].

Неонатальные В-клетки у мышей по своей природе относятся преимущественно к переходному типу, т.е. В-клеткам, недавно эмигрировавшим из костного мозга. В-клетки переходного типа определяются по высокому уровню IgM, низкому уровню IgD и CD23 и по экспрессии маркера AA4.1 [142, 143]. Такие переходные В-клетки недавно были идентифицированы у взрослых людей и в пуповинной крови; такие клетки присутствуют также у взрослых мышей, однако в очень малом количестве по сравнению с новорожденными мышами. Присутствие этих переходных клеток объясняет повышенную восприимчивость новорожденных животных к индукции В-клеточной толерантности и сниженный ответ на полисахаридные антигены. Интересно отметить, что переходный фенотип не изменяют цитокины IL-1 и IL-6, которые индуцируют специфичный к полисахаридам ответ неонатальных В-клеток. Было показано, что BAFF (известный также как BLyS) — цитокин, принадлежащий к семейству TNF, — необходим для созревания переходных В-клеток в фолликулярные В-клетки. У трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих BAFF, оказалось повышенным количество В-клеток краевой зоны и В-1-клеток (две субпопуляции, участвующие в ответе на полисахариды), и такие мыши продуцировали аутоантитела [144]. У взрослых животных добавление BAFF усиливало продукцию антител к пневмококковым полисахаридам. В настоящее время исследования, в которых изучали бы эффект BAFF на ответ неонатальных В-клеток, отсутствуют.

Стимуляция иммунного ответа организма мышей с помощью CpG

Установлено, что олигонуклеотиды, содержащие CpG-мотивы, являются мощными стимуляторами иммунного ответа благодаря действию на В-клетки, дендритные клетки и макрофаги. Была исследована возможность CpG-стимуляции преодолеть ареактивность неонатальных В-клеток к перекрестному связыванию В-клеточных рецепторов или к полисахаридным антигенам. Установлено, что добавление CpG позволяло неонатальным мышинным В-клеткам пролиферировать в ответ на антитела анти-IgM. Кроме того, в результате CpG-стимуляции неонатальные В-клетки приобретали способность продуцировать антитела к TNP-фиколу, полисахаридному TI-2-антигену. CpG влияет на выживаемость В-клеток, о чем свидетельствуют данные определения апоптоза и уровня белков выживаемости, например Bcl-X_L [138]. В этих экспериментах использовали высокоочищенные неонатальные В-клетки, что говорит о прямом действии CpG-ОДН непосредственно на В-клетки через рецептор TLR9. Kovarik и соавт. исследовали влияние CpG-ОДН на иммунизацию полисахаридом *in vivo*, отметив лишь ограниченный адъювантный эффект [145], что могло быть связано с периодом полужизни CpG *in vivo*.

Секреция цитокинов макрофагами

Как было указано ранее, для Т1-ответа нужны и макрофаги, и В-клетки. Роль макрофагов исследовали в экспериментах с клеточными смесями, когда взрослые В-клетки культивировали с очищенными макрофагами, полученными у новорожденных или взрослых мышей при Т1-стимуляции (ТНР-АПС). В этой системе неонатальные макрофаги не давали хелперного эффекта в отношении ответа на Т1-антиген, тогда как взрослые макрофаги способствовали полноценной продукции антител В-клетками. Указанный дефект хелперной функции неонатальных макрофагов обусловлен сниженной секрецией двух цитокинов — IL-1 и IL-6, играющих важную роль в В-клеточной активации. Оказалось, что неонатальные макрофаги имеют общий дефект продукции провоспалительных цитокинов, т.к. образуют меньшие количества TNF- α и IL-12, чем взрослые макрофаги, при стимуляции ТНР-АПС. Следует отметить, что продукция противовоспалительного цитокина IL-10 неонатальными мышинными макрофагами не снижена, а даже повышена по сравнению со взрослыми клетками. Такое повышенное образование IL-10 неонатальными макрофагами является причиной сниженной продукции провоспалительных цитокинов, поскольку секреция IL-1, IL-6 и TNF- α восстанавливается, если в культуру добавляют антитела к IL-10 или когда неонатальные макрофаги получают от нокаутных по гену IL-10 мышей. Антитела к IL-10 не только восстанавливают продукцию IL-6 неонатальными макрофагами, но также делают неонатальные клетки селезенки способными синтезировать антитела к ТНР-АПС в культуре [146, 147].

Недавно было установлено, что такие митогенные стимулы, как бактериальные АПС, распознаются членами семейства Toll-подобных рецепторов, в частности TLR4. Многие лиганды TLR имеют бактериальное происхождение. Например, пептидогликан стимулирует TLR2, бактериальный флагеллин — TLR5, а бактериальная ДНК, содержащая мотивы CpG, — TLR9. Для неонатальных макрофагов характерно подобное нарушение регуляции цитокинов независимо от того, идет ли речь о стимуляции лигандом TLR2, пептидогликаном или лигандом TLR9, CpG-ОДН. Это указывает на общий дефект сигнализации через TLR, приводящий к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов и повышению экспрессии противовоспалительных цитокинов, включая IL-10. Экспрессия рецепторов TLR неонатальными макрофагами сама по себе уменьшается не столь резко, хотя существуют определенные количественные различия между двумя возрастными группами. Молекулярная основа нарушения регуляции цитокинов у неонатальных макрофагов до сих пор неизвестна. Удивителен факт, что макрофаги двухлетних мышей обладают подобным фенотипом нарушения регуляции и неспособны к такой же продукции антител при введении ТНР-АПС, как молодые взрослые В-клетки [147]. Старые мыши и пожилые люди также гипореактивны к пневмококковым полисахаридным антигенам.

КОРРЕЛЯЦИЯ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМОВ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

Основываясь на данных, полученных в экспериментах на мышах, вмешательства, модифицирующие иммунный ответ организма неонатальных мышей, были рассмотрены применительно к новорожденным

детям [18, 20, 21, 100, 148–151]. Наиболее часто источником клеток новорожденных детей для исследовательских целей была пуповинная кровь, однако иногда использовали и периферическую кровь новорожденных детей. Популяции иммунных клеток исследовали либо в составе цельной крови [19], либо специфические популяции отделяли от других клеток различными методами, например с помощью градиента плотности [20, 21, 151], применяя флуоресцентные антитела к поверхностным маркерам и проточную цитометрию, магнитные антитела к поверхностным маркерам, позволяющие разделять клетки в сильном магнитном поле [18, 20], или используя клетки, обладающие собственными адгезивными свойствами [151]. Далее будут рассмотрены наиболее современные методы, имеющие потенциальное клиническое значение для работы с новорожденными детьми.

Вспомогательные клетки

Большое количество исследований было посвящено изучению эффектов глюкокортикостероидов на иммунный ответ организма мышей. Продукция макрофагов и их функции у мышей изменяются под влиянием стероидов по-разному в зависимости от времени введения и последовательности процессинга антигена и глюкокортикостероидов [152–159]. Введение глюкокортикостероидов самкам мышей после рождения потомства снижает передачу вирус-специфических IgG с молоком [160]. Функции неонатальных макрофагов человека и экспрессию поверхностных маркеров исследовали Orlikowsky и соавт. в двух работах. Показано, что макрофаги пуповинной крови в меньшей степени экспрессируют конститутивные маркеры активации CD80 и CD86; экспрессия этих маркеров возрастает не столь значительно, как у взрослых, при стимуляции циклическим аденозинмонофосфатом или лигандом CD40 (связывается с молекулой CD40 на В-клетках и стимулирует рост и созревание В-лимфоцитов) [161, 162]. Исследовали действие дексаметазона на макрофаги пуповинной крови, чтобы определить, как стероиды, введенные беременным женщинам в случае преждевременных родов, могут повлиять на иммунный ответ организма недоношенных детей [151]. Макрофаги пуповинной крови стимулировали IFN- γ или циклическим аденозинмонофосфатом с добавлением или без добавления дексаметазона. Установлено, что базовый уровень экспрессии CD80 и CD86 был сниженным; стимуляция IFN- γ повышала уровень экспрессии этих молекул, однако в меньшей степени, чем это наблюдалось у взрослых макрофагов. Добавление дексаметазона ингибировало повышение экспрессии, вызванное стимуляцией как взрослых клеток, так и макрофагов пуповинной крови, однако в последнем случае ингибиция была сильнее. При стимуляции циклическим аденозинмонофосфатом обнаружен сходный эффект, за исключением того, что экспрессия CD80 не возрастала в отличие от CD86 (в большей степени не возрастала у макрофагов взрослых, чем у макрофагов пуповинной крови); обработка дексаметазоном также ингибировала эффект (ингибиция ответа была сильнее у макрофагов пуповинной крови по сравнению с макрофагами взрослых) [151]. Эти исследования показывают, что введение беременным женщинам дексаметазона в случае преждевременных родов может снизить способность макрофагов новорожденных активироваться при стимуляции воспалительными цитокинами. Вследствие этого неонатальные макрофаги, и без того находясь в относительно неактивированном со-

стоянии, будут менее способны отвечать на инфекцию фагоцитозом микроорганизмов и секрецией цитокинов, необходимых для клеточного и гуморального иммунных ответов.

Дифференцировка и функции дендритных клеток мышей также изменяются при воздействии стероидов [158, 159, 163, 164]. В исследованиях с участием людей Mainali и соавт. изучали влияние дексаметазона на созревание дендритных клеток пуповинной крови и крови взрослых людей [150]. Обнаружено, что дексаметазон ингибирует экспрессию поверхностного маркера дендритных клеток (CD1a) и повышает экспрессию маркера макрофагов (CD14). Эти изменения были более выражены в клетках пуповинной крови. Дексаметазон изменял соотношение секреции цитокинов дендритными клетками и макрофагами таким образом, что секреция IL-10 (противовоспалительного цитокина) превосходила секрецию IL-12 (провоспалительного цитокина). У тех же клеток пуповинной крови, экспрессирующих маркер макрофагов CD14, под влиянием дексаметазона повышалась способность к эндоцитозу [150]. Эти данные показывают, что у новорожденных, получавших стероиды либо родившихся от матерей, которым вводили стероиды, уменьшен пул дендритных клеток, презентующих антигены наивным Т-клеткам, в результате сохранения клеток моноцитарной линии и отсутствия их созревания в дендритные клетки.

Дендритные клетки фагоцитируют апоптотические и некротические клетки, и в зависимости от типа поглощенных клеток возникает либо иммунный ответ (некротические клетки), либо толерантность (апоптотические клетки). Толерантность — это состояние ареактивности к антигену, даже если ранее был контакт с этим антигеном. Толерантность к аутоантигенам имеет большое значение для предотвращения аутоиммунных заболеваний [40]. Wong и соавт. исследовали ответ неонатальных ДК на погибающие клетки двух типов, сравнивая его с ответом взрослых ДК [100]. И те и другие ДК оказались способными фагоцитировать апоптотические и некротические клетки, однако взрослые ДК фагоцитировали большие количества каждого типа погибающих клеток. Повышение экспрессии молекул ГКГС класса II, CD80, CD86 и CD83 у ДК пуповинной крови было минимальным, тогда как у взрослых ДК, фагоцитировавших некротические клетки, повышение оказалось значительным. Стимулированные ДК вызывали активацию наивных Т-клеток; однако ДК пуповинной крови при воздействии некротических клеток или ЛПС были менее способны стимулировать пролиферацию Т-клеток по сравнению со взрослыми ДК. Стимуляция посредством ЛПС повышала экспрессию молекул ГКГС класса II, CD80, CD86, CD83 и CD40 как взрослыми ДК, так и ДК пуповинной крови, однако во втором случае это повышение было слабее.

Цитокины, продуцируемые ДК при стимуляции (TNF- α , IL-10 и IL-12p70), играют важную роль в модуляции типа Т-клеточного ответа. Дендритные клетки пуповинной крови оказались способны повышать секрецию TNF- α и IL-10, однако в меньшей степени, чем взрослые ДК. У взрослых ДК, но не у ДК пуповинной крови количество секретируемого IL-12p70 существенно повышено [100]. Известно, что продукция IL-12 усиливает дифференцировку Th1-клеток, тогда как IL-10 способен снижать развитие Th1-ответа. Склонность новорожденных детей к Th2-ответу может быть связана с этой особенностью фенотипа ДК. Эти исследования можно считать одними из первых, посвященных изучению роли вспомогательных клеток у новорожденных детей.

В-лимфоциты

Синтетические CpG-ОДН индуцируют пролиферацию, продукцию цитокинов и иммуноглобулинов В-лимфоцитами и дендритными клетками мышей [136, 165–168]. Стимулирующий эффект у мышей зависит от присутствия CpG-динуклеотидной последовательности так же, как от окружающих нуклеотидов, фланкированных двумя 5'-пуринами и 3'-пиримидинами (CpG-мотив) [135, 169, 170]. Взрослые В-клетки человека также могут быть стимулированы олигодезоксинуклеотидами, однако CpG-мотив, обязательный для активации В-клеток мышей, не является необходимым для В-клеток человека [171].

CpG-ОДН можно классифицировать по типу клеток, которые они способны стимулировать. Некоторые CpG-ОДН, действуя на высокоочищенные В-клетки взрослого человека, индуцируют пролиферацию, продукцию IgM, IgG и IgA и повышенную экспрессию поверхностных молекул CD86 (маркер В-клеточной активации) и CD25 (рецептор IL-2) [171]. Максимальную стимуляцию В-клеток человека (клеточная пролиферация, экспрессия CD80 и CD86, продукция Ig и секреция IL-6) вызывают олигодезоксинуклеотиды, обладающие резистентной к нуклеазам фосфоротиоат-модифицированной основой с одним или несколькими CpG-мотивами и отсутствием поли-G-мотива [172]. CpG-ОДН, индуцирующие Th1-ответ, а также сильно стимулирующие В-клетки, относятся к классу В (или типу К), тогда как класс А (или тип D) характеризуется способностью сильно активировать ЕК-клетки и секрецию IFN- α плазмоцитоидными ДК человека [173–175]. Третий класс CpG (класс С) сочетает свойства классов А и В: способность стимулировать В-клетки, активировать ЕК-клетки и продукцию IFN- α [176, 177]. CpG-ОДН класса В усиливают способность дендритных клеток продуцировать IL-12 и способствуют поляризации Т-клеточного ответа в направлении Th1. Некоторые CpG-ОДН проходят клинические испытания по усилению иммунного ответа при вакцинации против инфекций и раковых клеток [178–181].

Данные, полученные в животных моделях на мышах, позволили рассмотреть возможность усиления иммунного В-клеточного ответа новорожденных детей с помощью CpG-ОДН. В одной из работ было показано, что у В-лимфоцитов пуповинной крови и дендритных клеток в культуре цельной крови возрастает экспрессия CD40 в ответ на стимуляцию CpG, однако не так эффективно, как у взрослых [182]. CpG-ОДН способны стимулировать пролиферацию В-клеток пуповинной крови и повышать экспрессию CD86 и HLA-DR (поверхностных молекул, играющих роль во взаимодействии Т- и В-клеток). Индуцированная CpG-ОДН повышенная экспрессия поверхностных маркеров сходна у В-клеток пуповинной крови и взрослых В-клеток [18]. Пролиферация В-клеток пуповинной крови возрастает при стимуляции CpG-ОДН, однако данные о том, пролиферируют ли эти клетки в такой же степени, как и взрослые В-клетки в ответ на CpG-ОДН, противоречивы [18, 20]. Этот пролиферативный эффект возрастал у В-клеток обоих типов, если к обработанным CpG-ОДН клеткам добавляли анти-IgM [18]. Поликлональная продукция IgM клетками пуповинной крови в ответ на стимуляцию CpG-ОДН была столь же интенсивной, как и у взрослых клеток; однако клетки пуповинной крови продуцировали меньше IgG по сравнению со взрослыми клетками и не синтезировали IgA в ответ на CpG-ОДН [18, 20]. CpG-ОДН индуцировали также секрецию хемокинов В-клетками пуповинной

крови и взрослыми В-клетками (воспалительный белок макрофагов 1 α и воспалительный белок макрофагов 1 β), которая еще больше возростала при добавлении анти-IgM [18]. Важно отметить, что иммуноглобулины, образующиеся при поликлональном В-клеточном ответе на CpG-ОДН, содержали антитела, специфичные к полисахаридным антигенам [18, 20]. До настоящего времени не установлено, способны ли CpG-ОДН амплифицировать продукцию антител к полисахаридным антигенам В-клетками, как это наблюдается при введении вакцины, а не просто вызывать поликлональный ответ, возможно вследствие неопределимого количества специфичных к полисахаридам антител или же необходимости присутствия цитокинов, секретируемых Т-лимфоцитами или вспомогательными клетками. Исследования в этой области подтверждают, что неонатальные В-клетки могут функционировать подобно взрослым, однако для максимального ответа В-клеткам пуповинной крови необходимы особые условия.

РАЗЛИЧИЯ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

Селезенка новорожденных мышей в отличие от взрослых животных содержит незрелые В-клетки. При проведении исследований с участием людей обычно используют периферическую кровь новорожденных и дефицита функции лимфоцитов, как в селезенке мышей, у лимфоцитов периферической крови человека не обнаруживают [18]. В действительности В-клетки лимфоузлов мышей более зрелые, чем клетки селезенки, и спленэктомия мышей не влияет на их IgG1- и IgG2-ответ [59, 122]. В ответ на введение полисахаридных антигенов мыши преимущественно образуют антитела класса IgM, тогда как у человека это антитела IgG, IgA и IgM [183]. При TD-ответе организма новорожденных мышей образуется мало IgG2, тогда как новорожденные дети продуцируют малое количество IgG2 [73].

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДАННЫХ И НЕОБХОДИМОСТЬ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Идентификация специфических дефектов иммунного ответа организма новорожденных детей может определить стратегию лечения воспалительных процессов и инфекций у них. CpG-ОДН уже исследуют в экспериментах на взрослых мышах в качестве адьюванта для полисахаридных вакцин с целью повышения продукции антител в ответ на слабые антигены [184]. Существует гипотеза, что CpG-ОДН могут оказаться полезным средством при иммунизации новорожденных полисахаридными антигенами и есть возможность сделать 23-валентную вакцину из чистых полисахаридов *S. pneumoniae* (используемую сейчас для вакцинации пожилых людей) эффективной и для новорожденных. Кроме того, дальнейшее изучение стимулирующей способности CpG-ОДН у новорожденных может оказаться полезным в разработке программы вакцинации детей против *N. meningitidis*. Предполагается, что при использовании CpG-ОДН, необходим второй стимул для повышения специфического ответа на антиген, т.к. применение только CpG-ОДН в лабораторных условиях не увеличивает количество полисахаридного антигена в пуповинной крови.

В настоящее время для лечения инфекций и воспалительных процессов у новорожденных в распоряжении врачей, кроме антибио-

тиков и поддерживающей терапии, имеются ограниченные средства. Предприняты многочисленные попытки исследовать у взрослых пациентов роль антагонистов цитокинов и других противовоспалительных агентов в лечении септического шока [185–188]. Однако поскольку продукция цитокинов у новорожденных отличается от таковой у взрослых, могут понадобиться другие терапевтические подходы для новорожденных. Поскольку иммунный ответ организма новорожденных относительно супрессирован и на многие инфекции они неспособны дать адекватный иммунный ответ, более благоприятный эффект может быть получен с помощью стимулирующих цитокинов, а не противовоспалительных средств, используемых у взрослых. Кроме того, иммунная система недоношенных детей отличается даже от иммунной системы детей, родившихся в срок [47, 95, 97, 108, 111, 118, 162, 189–194]. Например, базовая концентрация IL-8 не зависит от гестационного возраста, однако в случае преждевременных родов продукция цитокина стимулированными моноцитами пуповинной крови ниже [97, 118]. Необходимы дальнейшие исследования для определения особенностей иммунного ответа организма недоношенных детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pereira LE, Bostik P and Ansari AA, et al.: The development of mouse APECED models provides new insight into the role of AIRE in immune regulation. *Clin Dev Immunol.* 12:2005; 211–216.
2. Kamnasaran D: Agenesis of the corpus callosum: lessons from humans and mice. *Clin Invest Med.* 28:2005; 267–282.
3. Meekins GD and Weiss MD: Electrodiagnostic studies in a murine model of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 16:2005; 967–979, ix.
4. Nico B, Roncali L, Mangieri D and Ribatti D: Blood-brain barrier alterations in MDX mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy. *Curr Neurovasc Res.* 2:2005; 47–54.
5. Gibson KM, Jakobs C, Pearl PL and Snead OC: Murine succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency, a heritable disorder of GABA metabolism with epileptic phenotype. *IUBMB Life.* 57:2005; 639–644.
6. Ramirez F and Dietz HC: Therapy insight: aortic aneurysm and dissection in Marfan's syndrome. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 1:2004; 31–36.
7. Kumar S and Anderson KC: Drug insight: thalidomide as a treatment for multiple myeloma. *Nat Clin Pract Oncol.* 2:2005; 262–270.
8. Pomper MG and Lee JS: Small animal imaging in drug development. *Curr Pharm Des.* 11:2005; 3247–3272.
9. Davies J, Turner M and Klein N: The role of the collectin system in pulmonary defence. *Paediatr Respir Rev.* 2:2001; 70–75.
10. Doganci A, Sauer K, Karwot R and Finotto S: Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol.* 28:2005; 257–270.
11. Chen J and Roop DR: Mouse models in preclinical studies for pachyonychia congenita. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 10:2005; 37–46.
12. Raja A and Engelhard HH: Animal models of leptomeningeal cancer. *Cancer Treat Res.* 125:2005; 159–179.
13. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J and Kogan S, et al.: Opinion: how patients have benefited from mouse models of acute promyelocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 5:2005; 821–827.
14. Keller C and Capocchi MR: New genetic tactics to model alveolar rhabdomyosarcoma in the mouse. *Cancer Res.* 65:2005; 7530–7532.
15. Paul R, Koedel U and Pfister HW: Development of adjunctive therapies for bacterial meningitis and lessons from knockout mice. *Neurocrit Care.* 2:2005; 313–324.
16. Hafelmeier S and Hardt WD: A mouse model for S. typhimurium-induced enterocolitis. *Trends Microbiol.* 13:2005; 497–503.
17. Solomon JB: Immunological milestones in the ontogeny of hamster, guinea pig, sheep, and man. *Fed Proc.* 37:1978; 2028–2030.

18. Tasker L and Marshall-Clarke S: Functional responses of human neonatal B lymphocytes to antigen receptor cross-linking and CpG DNA. *Clin Exp Immunol.* 134:2003; 409–419.
19. Halista SM, Johnson-Robbins LA and El-Mohandes AE, et al.: Characterization of early activation events in cord blood B cells after stimulation with T cell-independent activators. *Pediatr Res.* 43:1998; 496–503.
20. Landers CD and Bondada S: CpG oligodeoxynucleotides stimulate cord blood mononuclear cells to produce immunoglobulins. *Clin Immunol.* 116:2005; 236–245.
21. Prescott SL, Irwin S and Taylor A, et al.: Cytosine-phosphate-guanine motifs fail to promote T-helper type 1-polarized responses in human neonatal mononuclear cells. *Clin Exp Allergy.* 35:2005; 358–366.
22. Pabst HF and Kreth HW: Ontogeny of the immune response as a basis of childhood disease. *J Pediatr.* 97:1980; 519–534.
23. Douglas RM, Paton JC, Duncan SJ and Hansman DJ: Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis.* 148:1983; 131–137.
24. Broome CV and Breiman RF: Pneumococcal vaccine—past, present, and future. *N Engl J Med.* 325:1991; 1506–1508.
25. Delves PJ and Roitt IM: The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343:2000; 37–49.
26. Wald ER, Guerra N and Byers C: Upper respiratory tract infections in young children: duration of and frequency of complications. *Pediatrics.* 87:1991; 129–133.
27. Gray BM and Dillon HC: Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children. *Pediatr Infect Dis.* 5:1986; 201–207.
28. Klein JO: The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis.* 3:1981; 246–253.
29. Cadoz M: Potential and limitations of polysaccharide vaccines in infancy. *Vaccine.* 16:1998; 1391–1395.
30. Peter G and Klein JO: Streptococcus pneumoniae. In: Long SS, ed. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 2003; edn 2nd New York: Churchill Livingstone; 739–746.
31. Kaplan SL, Mason EO and Wald ER, et al.: Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics.* 113:2004; 443–449.
32. Dintzis RZ: Rational design of conjugate vaccines. *Pediatr Res.* 32:1992; 376–385.
33. Seppala I and Makela O: Antigenicity of dextran-protein conjugates in mice. Effect of molecular weight of the carbohydrate and comparison of two modes of coupling. *J Immunol.* 143:1989; 1259–1264.
34. Bixler GS, Eby R and Dermody KM, et al.: Synthetic peptide representing a T-cell epitope of CRM197 substitutes as carrier molecule in a Haemophilus influenzae type B (Hib) conjugate vaccine. *Adv Exp Med Biol.* 251:1989; 175–180.
35. Tai JY, Vella PP and McLean AA, et al.: Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugate vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 184:1987; 154–161.
36. Jennings HJ, Roy R and Gamian A: Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice by using an N-propionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J Immunol.* 137:1986; 1708–1713.
37. Tsay GC and Collins MS: Preparation and characterization of a nontoxic polysaccharide-protein conjugate that induces active immunity and passively protective antibody against Pseudomonas aeruginosa immunotype 1 in mice. *Infect Immun.* 45:1984; 217–221.
38. Gold R. Neisseria meningitidis. In: Long SS, ed. Principles and practice of pediatric infectious diseases (2nd edn). New York: Churchill Livingstone; 2003:748–756.
39. Pediatrics AA: Meningococcal Infections. In: Pickering LK, ed. Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 2003; edn 26th Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 430–436.
40. Delves PJ and Roitt IM: The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 343:2000; 108–117.
41. Engle WA, Schreiner RL and Baehner RL: Neonatal white blood cell disorders. *Semin Perinatol.* 7:1983; 184–200.
42. Krause PJ, Maderazo EG and Scroggs M: Abnormalities of neutrophil adherence in newborns. *Pediatrics.* 69:1982; 184–187.
43. Krause PJ, Malech HL and Kristie J, et al.: Polymorphonuclear leukocyte heterogeneity in neonates and adults. *Blood.* 68:1986; 200–204.
44. Anderson DC, Hughes BJ and Smith CW: Abnormal mobility of neonatal polymorphonuclear leukocytes. Relationship to impaired redistribution of surface adhesion sites by chemotactic factor or colchicine. *J Clin Invest.* 68:1981; 863–874.
45. Anderson DC, Rothlein R and Marlin SD, et al.: Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent adherence reactions. *Blood.* 76:1990; 2613–2621.

46. Abughali N, Berger M and Tosi MF: Deficient total cell content of CR3 (CD11b) in neonatal neutrophils. *Blood*. 83:1994; 1086–1092.
47. McEvoy LT, Zakem-Cloud H and Tosi MF: Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age. *Blood*. 87:1996; 3929–3933.
48. Bruce MC, Baley JE, Medvik KA and Berger M: Impaired surface membrane expression of C3bi but not C3b receptors on neonatal neutrophils. *Pediatr Res*. 21:1987; 306–311.
49. Quie PG and Mills EL: Bactericidal and metabolic function of polymorphonuclear leukocytes. *Pediatrics*. 64:1979; 719–721.
50. Speer C, Johnston RBJ. Neutrophil function in newborn infants. In: Polin R, Fox W, eds. *Fetal and neonatal physiology* (2nd edn). Philadelphia: W.B. Saunders; 1997:1954–1960.
51. Davis CA, Vallota EH and Forristal J: Serum complement levels in infancy: age related changes. *Pediatr Res*. 13:1979; 1043–1046.
52. Mills EL, Thompson T and Bjorksten B, et al.: The chemiluminescence response and bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophils from newborns and their mothers. *Pediatrics*. 63:1979; 429–434.
53. Stoerner JW, Pickering LK, Adcock EW and Morriss FH: Polymorphonuclear leukocyte function in newborn infants. *J Pediatr*. 93:1978; 862–864.
54. Tono-Oka T, Nakayama M, Uehara H and Matsumoto S: Characteristics of impaired chemotactic function in cord blood leukocytes. *Pediatr Res*. 13:1979; 148–151.
55. Miller MD: Natural defense mechanism: Development and characterization of innate immunity. In: Stiehm E and Fulginiti V, eds, *Immunologic disorders of infants and children*. 1973; Philadelphia: W.B. Saunders; 127.
56. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. B cell Activation and antibody production. In Schmitt W, Hacker HN, Ehlers J, eds. *Cellular and molecular immunology* (4th edn). Philadelphia: W.B. Saunders; 2000:182–207.
57. Prescott SL, Macaubas C and Smallacombe T, et al.: Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*. 353:1999; 196–200.
58. Prescott SL, Taylor A and King B, et al.: Neonatal interleukin-12 capacity is associated with variations in allergen-specific immune responses in the neonatal and postnatal periods. *Clin Exp Allergy*. 33:2003; 566–572.
59. Adkins B, Leclerc C and Marshall-Clarke S: Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. 4:2004; 553–564.
60. Hussey GD, Watkins ML and Goddard EA, et al.: Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies. *Immunology*. 105:2002; 314–324.
61. Vekemans J, Amedei A and Ota MO, et al.: Neonatal bacillus Calmette-Guerin vaccination induces adult-like IFN-gamma production by CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 31:2001; 1531–1535.
62. Prescott SL, Macaubas C and Yabuhara A, et al.: Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life. *Int Arch Allergy Immunol*. 113:1997; 75–79.
63. Prescott SL, Macaubas C and Holt BJ, et al.: Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol*. 160:1998; 4730–4737.
64. Marchant A, Appay V and Van Der Sande M, et al.: Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest*. 111:2003; 1747–1755.
65. Hermann E, Truyens C and Alonso-Vega C, et al.: Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood*. 100:2002; 2153–2158.
66. Morell A, Skvaril F, Hitzig WH and Barandun S: IgG subclasses: development of the serum concentrations in “normal” infants and children. *J Pediatr*. 80:1972; 960–964.
67. Oxelius VA: IgG subclass levels in infancy and childhood. *Acta Paediatr Scand*. 68:1979; 23–27.
68. Rijkers GT, Sanders EA, Breukels MA and Zegers BJ: Infant B cell responses to polysaccharide determinants. *Vaccine*. 16:1998; 1396–1400.
69. Rijkers GT, Sanders LA and Zegers BJ: Anti-capsular polysaccharide antibody deficiency states. *Immunodeficiency*. 5:1993; 1–21.
70. Schur PH, Rosen F and Norman ME: Immunoglobulin subclasses in normal children. *Pediatr Res*. 13:1979; 181–183.
71. Andersson B and Blomgren H: Evidence for thymus-independent humoral antibody production in mice against polyvinylpyrrolidone and E. coli lipopolysaccharide. *Cell Immunol*. 2:1971; 411–424.
72. Hale ML, Hanna EE and Hansen CT: Nude mice from homozygous nude parents show smaller PFC responses to sheep erythrocytes than nude mice from heterozygous mothers. *Nature*. 260:1976; 44–45.

73. Siegrist CA: Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*. 19:2001; 3331–3346.
74. Timens W, Rozeboom T and Poppema S: Fetal and neonatal development of human spleen: an immunohistological study. *Immunology*. 60:1987; 603–609.
75. Bondada S, Garg M. Thymus-independent antigens. Handbook of B and T lymphocytes. Academic Press; 1994:343–370.
76. Bondada S, Wu H, Robertson DA and Chelvarajan RL: Accessory cell defect in unresponsiveness of neonates and aged to polysaccharide vaccines. *Vaccine*. 19:2000; 557–565.
77. Mond JJ, Lees A and Snapper CM: T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol*. 13:1995; 655–692.
78. Gathings WE, Kubagawa H and Cooper MD: A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal humans. *Immunol Rev*. 57:1981; 107–126.
79. Nossal GJ: Cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Annu Rev Immunol*. 1:1983; 33–62.
80. Baker PJ: T cell regulation of the antibody response to bacterial polysaccharide antigens: an examination of some general characteristics and their implications. *J Infect Dis*. 165(Suppl 1):1992; S44–S48.
81. Landers CD, Chelvarajan RL and Bondada S: The role of B cells and accessory cells in the neonatal response to TI-2 antigens. *Immunol Res*. 31:2005; 25–36.
82. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Effector mechanisms of humoral immunity. In: Schmitt W, Hacker HN, Ehlers J, eds. Cellular and Molecular Immunology (4th edn). Philadelphia: W.B. Saunders; 2000:309–334.
83. Griffioen AW, Franklin SW, Zegers BJ and Rijkers GT: Expression and functional characteristics of the complement receptor type 2 on adult and neonatal B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol*. 69:1993; 1–8.
84. Barrett DJ, Sleasman JW, Schatz DA and Steinitz M: Human anti-pneumococcal polysaccharide antibodies are secreted by the CD5- B cell lineage. *Cell Immunol*. 143:1992; 66–79.
85. Brooks DA, Beckman IG and Bradley J, et al.: Human lymphocyte markers defined by antibodies derived from somatic cell hybrids. IV. A monoclonal antibody reacting specifically with a subpopulation of human B lymphocytes. *J Immunol*. 126:1981; 1373–1377.
86. Ibelgafts H (ed). COPE: Cytokines & cells online pathfinder encyclopaedia, vol 2005: Ibelgafts H; 2006.
87. Saito S, Morii T and Umekage H, et al.: Expression of the interleukin-2 receptor gamma chain on cord blood mononuclear cells. *Blood*. 87:1996; 3344–3350.
88. Zola H, Fusco M and Macardle PJ, et al.: Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: comparison with adult blood lymphocytes. *Pediatr Res*. 38:1995; 397–403.
89. Bohnsack JF and Brown EJ: The role of the spleen in resistance to infection. *Annu Rev Med*. 37:1986; 49–59.
90. Timens W, Boes A, Rozeboom-Uiterwijk T and Poppema S: Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *J Immunol*. 143:1989; 3200–3206.
91. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. General properties of immune responses. In: Schmitt W, Hacker HN, Ehlers J, eds. Cellular and molecular immunology (4th edn). Philadelphia: W.B. Saunders; 2000:3–16.
92. Kruetzmann S, Rosado MM and Weber H, et al.: Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen. *J Exp Med*. 197:2003; 939–945.
93. Graham CW, Saba TM, Lolekha S and Gotoff SP: Deficient serum opsonic activity for macrophage function in newborn infants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 143:1973; 991–994.
94. Das M, Henderson T and Feig SA: Neonatal mononuclear cell metabolism: further evidence for diminished monocyte function in the neonate. *Pediatr Res*. 13:1979; 632–634.
95. Gessler P, Kirchmann N and Kientsch-Engel R, et al.: Serum concentrations of granulocyte colony-stimulating factor in healthy term and preterm neonates and in those with various diseases including bacterial infections. *Blood*. 82:1993; 3177–3182.
96. Schibler KR, Liechty KW and White WL, et al.: Defective production of interleukin-6 by monocytes: a possible mechanism underlying several host defense deficiencies of neonates. *Pediatr Res*. 31:1992; 18–21.
97. Schibler KR, Liechty KW, White WL and Christensen RD: Production of granulocyte colony-stimulating factor in vitro by monocytes from preterm and term neonates. *Blood*. 82:1993; 2478–2484.
98. Pillay V, Savage N and Laburn H: Circulating cytokine concentrations and cytokine production by monocytes from newborn babies and adults. *Pflugers Arch*. 428:1994; 197–201.

99. Kapenberg ML, Jansen MM. Antigen presentation and immunoregulation. In: Adkinson MF, Yunginger JW, Busse WW, et al., eds. Middleton's allergy: principles and practice (6th edn). Philadelphia: Mosby; 2003:178.
100. Wong OH, Huang FP and Chiang AK: Differential responses of cord and adult blood-derived dendritic cells to dying cells. *Immunology*. 116:2005; 13–20.
101. Joyner JL, Augustine NH and Taylor KA, et al.: Effects of group B streptococci on cord and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon-gamma mRNA accumulation and protein secretion. *J Infect Dis*. 182:2000; 974–977.
102. Goriely S, Vincart B and Stordeur P, et al.: Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol*. 166:2001; 2141–2146.
103. Upham JW, Lee PT and Holt BJ, et al.: Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infect Immun*. 70:2002; 6583–6588.
104. Stefanovic V, Golubovic E, Vlahovic P and Mitic-Zlatkovic M: Age-related changes in IL-12 production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *J Intern Med*. 243:1998; 83–84.
105. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ and Goldblatt D: Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol*. 128:2002; 118–123.
106. Marodi L, Goda K, Palicz A and Szabo G: Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN-gamma. *Clin Exp Immunol*. 126:2001; 456–460.
107. De Wit D, Olislagers V and Goriely S, et al.: Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood*. 103:2004; 1030–1032.
108. Bessler H, Komlos L and Punsky I, et al.: CD14 receptor expression and lipopolysaccharide-induced cytokine production in preterm and term neonates. *Biol Neonate*. 80:2001; 186–192.
109. Hebra A, Strange P and Egbert JM, et al.: Intracellular cytokine production by fetal and adult monocytes. *J Pediatr Surg*. 36:2001; 1321–1326.
110. Peters AM, Bertram P, Gahr M and Speer CP: Reduced secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha by neonatal monocytes. *Biol Neonate*. 63:1993; 157–162.
111. Weatherstone KB and Rich EA: Tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 secretion by cord blood monocytes from premature and term neonates. *Pediatr Res*. 25:1989; 342–346.
112. Cohen L, Haziot A and Shen DR, et al.: CD14-independent responses to LPS require a serum factor that is absent from neonates. *J Immunol*. 155:1995; 5337–5342.
113. Glover DM, Brownstein D and Burchett S, et al.: Expression of HLA class II antigens and secretion of interleukin-1 by monocytes and macrophages from adults and neonates. *Immunology*. 61:1987; 195–201.
114. Muller K, Zak M and Nielsen S, et al.: In vitro cytokine production and phenotype expression by blood mononuclear cells from umbilical cords, children and adults. *Pediatr Allergy Immunol*. 7:1996; 117–124.
115. Berner R, Csorba J and Brandis M: Different cytokine expression in cord blood mononuclear cells after stimulation with neonatal sepsis or colonizing strains of *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr Res*. 49:2001; 691–697.
116. Schultz C, Rott C and Temming P, et al.: Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res*. 51:2002; 317–322.
117. Karlsson H, Hessle C and Rudin A: Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infect Immun*. 70:2002; 6688–6696.
118. Dembinski J, Behrendt D and Heep A, et al.: Cell-associated interleukin-8 in cord blood of term and preterm infants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 9:2002; 320–323.
119. Bryson YJ, Winter HS and Gard SE, et al.: Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborns. *Cell Immunol*. 55:1980; 191–200.
120. Hartel C, Adam N and Strunk T, et al.: Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol*. 142:2005; 446–453.
121. Schultz C, Temming P and Bucsky P, et al.: Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol*. 135:2004; 130–136.
122. Adkins B, Williamson T, Guevara P and Bu Y: Murine neonatal lymphocytes show rapid early cell cycle entry and cell division. *J Immunol*. 170:2003; 4548–4556.
123. Adkins B, Bu Y, Vincek V and Guevara P: The primary responses of murine neonatal lymph node CD4+ cells are Th2-skewed and are sufficient for the development of Th2-biased memory. *Clin Dev Immunol*. 10:2003; 43–51.
124. Ridge JP, Fuchs EJ and Matzinger P: Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science*. 271:1996; 1723–1726.
125. Winkler S, Willheim M and Baier K, et al.: Frequency of cytokine-producing T cells in patients of different age groups with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 179:1999; 209–216.

126. Adkins B, Bu Y and Guevara P: Murine neonatal CD4⁺ lymph node cells are highly deficient in the development of antigen-specific Th1 function in adoptive adult hosts. *J Immunol.* 169:2002; 4998–5004.
127. Qureshi MH and Garvy BA: Neonatal T cells in an adult lung environment are competent to resolve *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Immunol.* 166:2001; 5704–5711.
128. King LB, Norvell A and Monroe JG: Antigen receptor-induced signal transduction imbalances associated with the negative selection of immature B cells. *J Immunol.* 162:1999; 2655–2662.
129. Marshall-Clarke S, Tasker L and Parkhouse RM: Immature B lymphocytes from adult bone marrow exhibit a selective defect in induced hyperexpression of major histocompatibility complex class II and fail to show B7.2 induction. *Immunology.* 100:2000; 141–151.
130. Benschop RJ, Brandl E, Chan AC and Cambier JC: Unique signaling properties of B cell antigen receptor in mature and immature B cells: implications for tolerance and activation. *J Immunol.* 167:2001; 4172–4179.
131. Balazs M, Martin F, Zhou T and Kearney J: Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity.* 17:2002; 341–352.
132. Martin F and Kearney JF: Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol.* 2:2002; 323–335.
133. Wardemann H, Boehm T, Dear N and Carsetti R: B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med.* 195:2002; 771–780.
134. Mosier DE and Johnson BM: Ontogeny of mouse lymphocyte function. II. Development of the ability to produce antibody is modulated by T lymphocytes. *J Exp Med.* 141:1975; 216–226.
135. Klinman DM, Yi AK and Beaucage SL, et al.: CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:1996; 2879–2883.
136. Krieg AM, Yi AK and Matson S, et al.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 374:1995; 546–549.
137. Bird AP: CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 321:1986; 209–213.
138. Chelvarajan RL, Raithatha R and Venkataraman C, et al.: CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. *Eur J Immunol.* 29:1999; 2808–2818.
139. Chelvarajan RL, Gilbert NL and Bondada S: Neonatal murine B lymphocytes respond to polysaccharide antigens in the presence of IL-1 and IL-6. *J Immunol.* 161:1998; 3315–3324.
140. Snapper CM, Rosas FR, Moorman MA and Mond JJ: Restoration of T cell-independent type 2 induction of Ig secretion by neonatal B cells in vitro. *J Immunol.* 158:1997; 2731–2735.
141. Buchanan RM, Arulanandam BP and Metzger DW: IL-12 enhances antibody responses to T-independent polysaccharide vaccines in the absence of T and NK cells. *J Immunol.* 161:1998; 5525–5533.
142. Allman D, Lindsley RC and DeMuth W, et al.: Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol.* 167:2001; 6834–6840.
143. Loder F, Mutschler B and Ray RJ, et al.: B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med.* 190:1999; 75–89.
144. Gavin AL, Duong B and Skog P, et al.: deltaBAFF, a splice isoform of BAFF, opposes full-length BAFF activity in vivo in transgenic mouse models. *J Immunol.* 175:2005; 319–328.
145. Kovarik J, Bozzotti P and Tougne C, et al.: Adjuvant effects of CpG oligodeoxynucleotides on responses against T-independent type 2 antigens. *Immunology.* 102:2001; 67–76.
146. Chelvarajan L, Popa D, Liu Y, et al.: Molecular mechanisms underlying anti-inflammatory phenotype of neonatal splenic macrophages. *J Leukoc Biol.* 82:2007; 403–416.
147. Chelvarajan RL, Collins SM, Van Willigen JM and Bondada S: The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. *J Leukoc Biol.* 77:2005; 503–512.
148. Li L, Godfrey WR and Porter SB, et al.: CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy. *Blood.* 106:2005; 3068–3073.
149. Forster-Waldl E, Sadeghi K and Tamandl D, et al.: Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. *Pediatr Res.* 58:2005; 121–124.

150. Mainali ES, Kikuchi T and Tew JG: Dexamethasone inhibits maturation and alters function of monocyte-derived dendritic cells from cord blood. *Pediatr Res.* 58:2005; 125–131.
151. Orlikowsky TW, Dannecker GE and Spring B, et al.: Effect of dexamethasone on B7 regulation and T cell activation in neonates and adults. *Pediatr Res.* 57:2005; 656–661.
152. Szakacs J, Lazar G, Lazar G and Husztki E: The effect of the glucocorticoid Oradexon on endotoxin-induced peritoneal cell response. *Acta Physiol Hung.* 87:2000; 161–166.
153. Mlambo G and Sigola LB: Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF-alpha production. *Int Immunopharmacol.* 3:2003; 513–522.
154. Willment JA, Lin HH and Reid DM, et al.: Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 171:2003; 4569–4573.
155. Bradley LM and Mishell RI: Differential effects of glucocorticosteroids on the functions of helper and suppressor T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:1981; 3155–3159.
156. Evans GF and Zuckerman SH: Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance. *Eur J Immunol.* 21:1991; 1973–1979.
157. Calandra T, Bernhagen J and Metz CN, et al.: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 377:1995; 68–71.
158. Kitajima T, Ariizumi K, Bergstresser PR and Takashima A: A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J Clin Invest.* 98:1996; 142–147.
159. Pan J, Ju D and Wang Q, et al.: Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett.* 76:2001; 153–161.
160. Yorty JL, Schultz SA and Bonneau RH: Postpartum maternal corticosterone decreases maternal and neonatal antibody levels and increases the susceptibility of newborn mice to herpes simplex virus-associated mortality. *J Neuroimmunol.* 150:2004; 48–58.
161. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Lymphocyte maturation and expression of antigen receptor genes. In: Schmitt W, Hacker HN, Ehlers J, eds. Cellular and molecular immunology (4th edn). Philadelphia: W.B. Saunders; 2000:125–160.
162. Orlikowsky TW, Spring B and Dannecker GE, et al.: Expression and regulation of B7 family molecules on macrophages (MPhi) in preterm and term neonatal cord blood and peripheral blood of adults. *Cytometry B Clin Cytom.* 53:2003; 40–47.
163. Hoetzenecker W, Meingassner JG and Ecker R, et al.: Corticosteroids but not pimecrolimus affect viability, maturation and immune function of murine epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 122:2004; 673–684.
164. Aberer W, Stingl L, Pogantsch S and Stingl G: Effect of glucocorticosteroids on epidermal cell-induced immune responses. *J Immunol.* 133:1984; 792–797.
165. Hartmann G and Krieg AM: CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther.* 6:1999; 893–903.
166. Hartmann G, Weiner GJ and Krieg AM: CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:1999; 9305–9310.
167. Crabtree TD, Jin L and Raymond DP, et al.: Preexposure of murine macrophages to CpG oligonucleotide results in a biphasic tumor necrosis factor alpha response to subsequent lipopolysaccharide challenge. *Infect Immun.* 69:2001; 2123–2129.
168. Sweet MJ, Campbell CC and Sester DP, et al.: Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol.* 168:2002; 392–399.
169. Krieg AM: An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med.* 128:1996; 128–133.
170. Krieg AM: Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol.* 4:1996; 73–76.
171. Liang H, Nishioka Y and Reich CF, et al.: Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest.* 98:1996; 1119–1129.
172. Krieg AM: Now I know my CpGs. *Trends Microbiol.* 9:2001; 249–252.
173. Krug A, Rothenfusser S and Hornung V, et al.: Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 31:2001; 2154–2163.
174. Ballas ZK, Rasmussen WL and Krieg AM: Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol.* 157:1996; 1840–1845.
175. Verthelyi D, Ishii K and Gursel M, et al.: Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol.* 166:2001; 2372–2377.

176. Marshall JD, Fearon K and Abbate C, et al.: Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol.* 73:2003; 781–792.
177. Vollmer J, Weeratna R and Payette P, et al.: Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol.* 34:2004; 251–262.
178. Carpentier A, Laigle-Donadey F and Zohar S, et al.: Phase I trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology.* 8:2006; 60–66.
179. Cooper CL, Davis HL and Angel JB, et al.: CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *Aids.* 19:2005; 1473–1479.
180. Broide DH: DNA vaccines: an evolving approach to the treatment of allergic disorders. *Allergy Asthma Proc.* 26:2005; 195–198.
181. Friedberg JW, Kim H and McCauley M, et al.: Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity. *Blood.* 105:2005; 489–495.
182. Pichyangkul S, Yongvanitchit K and Kum-arb U, et al.: Whole blood cultures to assess the immunostimulatory activities of CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol Methods.* 247:2001; 83–94.
183. Adderson EE: Antibody repertoires in infants and adults: effects of T-independent and T-dependent immunizations. *Springer Semin Immunopathol.* 23:2001; 387–403.
184. Chu RS, McCool T and Greenspan NS, et al.: CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants for pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines and enhance antipolysaccharide immunoglobulin G2a (IgG2a) and IgG3 antibodies. *Infect Immun.* 68:2000; 1450–1456.
185. Bernard GR, Vincent JL and Laterre PF, et al.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 344:2001; 699–709.
186. Das UN: Current advances in sepsis and septic shock with particular emphasis on the role of insulin. *Med Sci Monit.* 9:2003; RA181–RA192.
187. Freeman BD, Zehnbauser BA and Buchman TG: A meta-analysis of controlled trials of anticoagulant therapies in patients with sepsis. *Shock.* 20:2003; 5–9.
188. Vincent JL, Abraham E and Annane D, et al.: Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care.* 6(Suppl 3):2002; S1–S18.
189. Gengenbacher D, Salm H, Vogt A and Schneider H: Detection of cell surface determinants for anti-Leu M3 (CD14), MY9 (CD33) and MY4 (CD14) and phagocytic function of cord blood monocytes in the course of gestational age. *Bone Marrow Transplant.* 22(Suppl 1):1998; S48–S51.
190. Blahnik MJ, Ramanathan R, Riley CR and Mino P: Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and IL-10 production by lung macrophages from preterm and term neonates. *Pediatr Res.* 50:2001; 726–731.
191. Schibler KR, Trautman MS and Liechty KW, et al.: Diminished transcription of interleukin-8 by monocytes from preterm neonates. *J Leukoc Biol.* 53:1993; 399–403.
192. Dembinski J, Behrendt D and Martini R, et al.: Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine.* 21:2003; 200–206.
193. Dembinski J, Behrendt D, Reinsberg J, Bartmann P: Endotoxin-stimulated production of IL-6 and IL-8 is increased in short-term cultures of whole blood from healthy term neonates. *Cytokine.* 18:2002; 116–119.
194. Dembinski J, Martini R, Behrendt D and Bartmann P: Modification of cord blood IL-6 production with IgM enriched human immunoglobulin in term and preterm infants. *Cytokine.* 26:2004; 25–29.