

Prenatalna ontogeneza limfocytów u świń^{*)}

MAŁGORZATA POMORSKA-MÓL, IWONA MARKOWSKA-DANIEL

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I.

Prenatal ontogeny of lymphocytes in pigs

Summary

The structure and function of the immune system of pigs are the main subjects of interest to numerous research centers, which is undoubtedly related to the potential of using pig organs in xenotransplantation. Another reason for intensive studies on this subject is the need for secure and effective immunoprophylaxis of pigs and the improvement of their immunological status. The present paper presents the current knowledge on the prenatal ontogeny of lymphocytes in pigs. The ontogeny of pigs' immune system starts in early gestation. During the prenatal period the system undergoes numerous changes which ultimately result in its achievement of immunological competence. Although the immune system in pigs is physiologically developed already on the 35th day of pregnancy, only a small numbers of lymphocytes and other lymphatic elements can be detected in fetal organs. The hematopoiesis in bone marrow starts around the 45th day of pregnancy. Lymph nodes, including mesenteric lymph nodes, are devoid of their defense function until the 70th day of prenatal life. The most dynamic development of the immune system of pigs takes place between the 60th and 90th day of gestation. To a greater extent, the diffusion of lymphocytes in secondary lymphatic organs occurs after birth, and the intensity of this process seems to be related to the colonization of the gut and enhanced by the contact of newborns with environmental antigens.

Keywords: pigs, prenatal ontogeny, immunological system

Budowa i funkcjonowanie układu odpornościowego świń jest przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków naukowych, co niewątpliwie wynika z badań nad możliwością wykorzystania narządów trzody chlewnej do ksenotransplantacji. Zbyt wiele problemów etycznych związanych z wykorzystaniem w ksenotransplantacji gatunków innych naczelnych wymagało znalezienia potencjalnego dawcy wśród organizmów filogenetycznie odległych. Z wielu powodów optymalnym gatunkiem wydaje się świnia. Świnie są stosunkowo łatwe i tanie w hodowli, rozmnażają się szybko, mają liczne potomstwo. Mają zbliżone parametry anatomiczne i fizjologiczne np.: osmolarność moczu, wielkość filtracji kłębuszkowej i przepływ krwi przez nerki. Podobny jest rzut minutowy serca i ciśnienie tętnicze. Niektóre hormony (insulina) oraz czynniki tkankowe (czynnik VIII krzepnięcia) działają na organizm ludzki, co potwierdza ich szerokie zastosowanie w klinice. Perfuzja krwi przez wątrobę świni pozwala na detoksykację chorych w śpiączce wątrobowej (8). Znaczny dystans filogenetyczny jest jednak powodem ogromnych problemów immunologicznych po przeszczepie, choć potencjalnie zmniejsza ryzyko zakażeń wirusowych.

Kolejnym powodem intensywne badań nad budową i funkcjonowaniem układu odpornościowego świń jest niewątpliwie potrzeba zapewnienia skutecznej immunoprofilaktyki chorób trzody chlewnej oraz dążenie do poprawy statusu immunologicznego zwierząt tego gatunku. Wiedza na temat ochronnych właściwości różnych mechanizmów czy elementów odpornościowych (komórkowych i humoralnych) daje szansę na zwiększenie efektywności szczepień profilaktycznych oraz bardziej precyzyjne ustalenie optymalnych terminów ich stosowania. Szczegółowe badania nad odpowiedzią gospodarza na dany patogen, ustalenie drogi rozprzestrzeniania się różnych antygenów w organizmie oraz identyfikacja epitopów specyficznych dla danego antygeny mogą przyczynić się także do uzyskania nowych, bardziej skutecznych szczepionek.

Prenatalny rozwój układu odpornościowego u świń

Układ odpornościowy świń powstaje i zaczyna rozwijać się we wczesnym okresie życia płodowego. W trakcie rozwoju prenatalnego w jego obrębie zachodzi szereg zmian, które przybliżają go do osiągnięcia kompetencji immunologicznej. Proces dojrzewania układu immunologicznego w okresie ciąży, a zwłaszcza w okresie neonatalnym, nie ogranicza się jedynie do nabywania odporności w stosunku do patogenów,

^{*)} Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy nr NN 308 275934.

ale obejmuje także dojrzewanie poszczególnych jego elementów (miejscowych i ogólnoustrojowych) oraz uzyskiwanie zdolności do adekwatnego reagowania na różne bodźce zewnętrzne (tolerancja/protekcja) (7).

Ciąża u świń trwa 114-115 dni. W embrionie trzody chlewnej wysepki krwiotwórcze obserwuje się już ok. 16. dnia ciąży, rozwój tkanek grasicy ok. 21. dnia, a śledziony w 22. dniu (19). Grasica jako pierwotny narząd limfatyczny jest niezmiernie istotna w rozwoju limfocytów T. Jak stwierdzono, usunięcie grasicy u nowo narodzonych prosiąt skutkuje obniżeniem się o ok. 95%, liczby limfocytów T „zerowych” z receptorem $\gamma\delta$.

Pomimo że układ limfatyczny jest fizjologicznie rozwinięty już pod koniec organogenezy (35. dzień ciąży), w narządach płodu można wykryć obecność jedynie niewielkiej liczby limfocytów i innych elementów limfatycznych, a hematopoeza w szpiku kostnym rozpoczyna się dopiero ok. 45. dnia ciąży. Węzły chłonne, w tym również węzły chłonne krezkowe, są pozbawione swej funkcji obronnej aż do 70. dnia ciąży. Podstawowe struktury tworzące skupiska tkanki limfatycznej związanej z jelitami (gut-associated lymphoid tissue, GALT), np. kępki Peyera, rozwijają się także podczas życia płodowego, podobnie jak u płodów ludzkich.

Komórki układu odpornościowego wywodzą się z multipotencjalnych komórek macierzystych, z których rozwija się komórka macierzysta potomna. W wyniku działania swoistych czynników, w tym cytokin, dochodzi do wyodrębnienia czterech typów komórek ukierunkowanych, z których powstają: komórki mieloidalne (granulocyty, monocyty, makrofagi i komórki prezentujące antygen), megakariocytarne (płytki krwi), erytroidalne (erytrocyty) oraz limfoidalne (limfocyty T i B) (1). Komponenty komórkowe wrodzonej odporności, takie jak: leukocyty, makrofagi czy komórki dendrytyczne, pojawiają się wraz z początkiem hemopoetycznej aktywności pierwotnych narządów limfatycznych. Pierwotnym narządem włączonym w aktywność limfopoetyczną w embrionie świni jest woreczek żółtkowy. W nim, w tzw. okresie pozazarodkowym, biorą początek komórki macierzyste. Tworzą one wysępki krwiotwórcze, wokół których z komórek śród błonka powstają naczynia. Okres ten trwa krótko i przechodzi w hematopoezę śródzarodkową. W jej przebiegu można wyróżnić etapy: wątrobowy, śledzionowy i szpikowy (1, 19).

Woreczek żółtkowy świń ulega inwolucji już ok. 27. dnia ciąży, tak więc jego rola w syntezie limfocytów jest raczej marginalna i przejściowa. Procesy limfopoezy u świń są częściowo powiązane z hematopoezą, chociażby przez to, że limfocyty B u tego gatunku zwierząt dojrzewają w pierwotnych narządach krwiotwórczych (1, 19). Grasica jest zasiedlana przez komórki prekursorowe limfocytów T z tych samych centrów hemopoetycznych, w których powstają limfocyty B. Aktywność limfopoetyczna szpiku w zakre-

Tab. 1. Aktywność limfo- i hemopoetyczna w okresie życia płodowego świń (19)

Narząd/tkanka	Aktywność hemopoetyczna	Pierwsze limfocyty		
		T $\alpha\beta$	T $\gamma\beta$	B
Woreczek żółtkowy	od 16 do 27	-	-	-
Wątroba	od 30 do porodu (wzrastająca)	58	45	30
Krew	-	58	45	40
Śledziona	-	58	45	40
Grasica	-	55	40	55
Szpik kostny	od 45 do porodu (wzrastająca)	60	60	55

sie produkcji limfocytów B zaczyna się około 45.-55. dnia ciąży (19). Okres aktywności limfo- i hemopoetycznej poszczególnych narządów limfatycznych w rozwoju prenatalnym świń przedstawiono w tab. 1.

Limfocyty w rozwoju płodowym świń

Mechanizmy swoistej odporności nabytej bazują w zasadzie na dwóch populacjach komórek, tj. limfocytach T i B. Populacje te, stymulowane przez komórki dendrytyczne czy monocyty, generują odpowiedź swoistą, specyficzną dla określonego antygeny oraz, co bardzo istotne, generują także populację komórek odpowiedzialnych za błyskawiczną reakcję anamnestyczną ustroju, czyli komórki pamięci immunologicznej (6). Aktywacja komórek B może być stosunkowo łatwo wykryta poprzez oznaczenie ich produktów, czyli immunoglobulin (Ig). Natomiast staranna analiza antygenowo-swoistej odpowiedzi limfocytów T wymaga już bardziej szczegółowej wiedzy na temat poszczególnych subpopulacji tej linii komórek.

W badaniach przeprowadzonych przez Sinkorę i wsp. (21) wykazano, że główne populacje limfocytów pojawiają się w organizmie płodu w drugim trymestrze ciąży. Pierwsze limfocyty są wykrywane we krwi pępowinowej i śledzionie około 40. dnia ciąży i około 45. dnia w obrębie krezki (21). Należy tu podkreślić, że komórki o fenotypie CD45⁺ (czyli leukocyty) mogą być obecne w śledzionie i krwi pępowinowej już w 35. dniu rozwoju płodowego oraz ok. 40. dnia w mezenterium, jednak nie wykazują one ekspresji typowych markerów różnicowania dla poszczególnych subpopulacji limfocytów (19).

Limfocyty B

Limfocyty obwodowe z ekspresją błonowej immunoglobuliny M (surface IgM, sIgM) pojawiają się we wcześniejszym okresie ontogenezy niż komórki T i pozostają główną populacją limfocytów w śledzionie, krwi oraz węzłach chłonnych do 55. dnia ciąży (19, 21). Jak wykazały badania prowadzone przez Sinkorę i wsp. (21), pierwsze limfocyty B pojawiają się w wątrobie płodu trzody chlewnej ok. 40. dnia ciąży. W 50.

dniu ciąży w śledzionie płodu, a w 60. dniu w jego szpiku potwierdzono obecność komórek z ekspresją receptora sIgM⁺ na powierzchni (19). Niewielkie ilości Ig mogą być wydzielane przez komórki B w śledzionie i wątrobie począwszy od 50. dnia ciąży. Spontaniczne przełączanie z klasy IgM do IgG występuje w obrębie grasicy (3, 21). Dodatkowo w surowicy płodowej świń pobranej w 44. dniu ciąży stwierdzono obecność przeciwciał klasy M, G i A oraz potwierdzono zdolność płodowych komórek wątrobowych pobranych w tym samym czasie do wydzielania immunoglobulin klasy M (21). Biorąc powyższe dane pod uwagę należałoby uznać, że limfocyty B mogą być jednymi z pierwszych aktywnych immunologicznie subpopulacji limfocytów płodowych. Ponadto potwierdzono, że wszystkie płodowe limfocyty sIgM⁺ są dodatkowo SLA-DR⁺ (swine leukocyte antigen, jest to główny układ zgodności tkankowej u trzody chlewnej, SLA-DR jest synonimem MHC klasy II), CD45RC⁺ (ekspresja poszczególnych izoform CD45 wskazuje na stan czynnościowy) i CD2⁺. Potwierdzono ponadto, że ekspresja CD2 pojawia się na limfocytach B jeszcze wcześniej niż sIgM⁺, prawdopodobnie już na prekursorach tych limfocytów (19, 21). Ponad 90% płodowych komórek sIgM⁺ wykazuje jednocześnie ekspresję CD2. W tym miejscu należy zaznaczyć, że ogromna większość limfocytów B występująca w okresie postnatalnym zarówno u młodych, jak i u dorosłych świń nie wykazuje ekspresji CD2 na swojej powierzchni (19, 21). Proporcja limfocytów B CD2⁻ wzrasta znacząco wraz z wiekiem zwierzęcia. Wskazuje to, że u świń, podobnie jak u innych gatunków zwierząt, dojrzałe limfocyty B charakteryzują się brakiem CD2 na swej powierzchni (21). Wydaje się, że ekspresja CD2 na powierzchni komórek B, podobnie jak ekspresja CD8 na limfocytach T, może odzwierciedlać status czynnościowy komórek (21). Potwierdzeniem tych informacji może być fakt, że znacząca liczba limfocytów B pozbawionych ekspresji CD2 na swojej powierzchni występuje u zwierząt po zasiedleniu jelit mikroflorą (21). Może to świadczyć o tym, że ekspresja CD2 na powierzchni komórek B zanika po ich aktywacji. Stwierdzono także, że zarówno płodowe limfocyty B, jak i występujące u osobników dojrzałych wykazują na swej powierzchni ekspresję MHC II klasy, analogicznie jak to ma miejsce u ludzi (21).

Limfocyty T

Grasica świń, podobnie jak u innych wyższych kręgowców, jest wyspecjalizowanym narządem limfatycznym, w którym zachodzi dojrzewanie limfocytów T (4). We wczesnym okresie perinatalnym grasica jest kolonizowana przez prekursorów limfocytów T pochodzące ze szpiku kostnego. Limfocyty T należą do elementów odporności adaptacyjnej i spełniają szereg funkcji zarówno obronnych, jak i regulacyjnych (6, 9). Wykryto je w śledzionie i krwi pępowinowej płodu już w 45., a w krezce w 50. dniu ciąży. Pojawiają się

one ok. 5 dni później niż limfocyty z ekspresją sIgM⁺ (19, 21). Spośród limfocytów T najwcześniej wykrywane są limfocyty Tγδ⁺ (20). Rozwijają się one początkowo w grasicy, a następnie przechodzą do obwodowych narządów limfatycznych i do krwi. Liczba limfocytów Tγδ pozostaje na mniej więcej stałym, niewielkim poziomie do około 90. dnia ciąży. W końcowym okresie życia płodowego większość limfocytów Tγδ kumuluje się w śledzionie oraz we krwi. Komórki te praktycznie nie występują w węzłach chłonnych krezkowych (19, 21). Limfocyty CD2⁺CD8^{lo}Tγδ również stwierdzane są w niewielkiej ilości podczas rozwoju płodowego. Komórki CD2⁺CD8⁻ i CD2⁻CD8⁻Tγδ⁺ ulegają silnemu rozplemowi po 90. dniu ciąży. Pierwsze z nich skupiają się głównie w obrębie śledziony, drugie natomiast we krwi obwodowej. W późniejszym okresie ontogenezy odsetek komórek TCRγδ⁺ gwałtownie spada, a dominującą populacją stają się tymocyty TCRαβ⁺ (21). Do znaczącego wzrostu liczby limfocytów Tγδ dochodzi w okresie życia postnatalnego. Wraz z wiekiem zwierzęcia wzrasta także liczba komórek CD2⁺CD8^{lo}Tγδ. Liczba limfocytów Tαβ wzrasta gwałtownie od 55. dnia ciąży i osiąga poziom *plateau* ok. 90. dnia rozwoju wewnątrzmacicznego. W tym okresie wzrasta również liczba limfocytów B. W efekcie głównymi populacjami limfocytów stwierdzanymi pod koniec ciąży w obwodowych tkankach i narządach limfatycznych płodu świń są limfocyty sIgM⁺ i Tαβ⁺. Około 90. dnia rozwoju prenatalnego proporcja pomiędzy limfocytami B i T jest różna, w zależności od badanego narządu płodu, jednak podobna do obserwowanej u nowo narodzonych prosiąt (19, 21).

Limfocyty pomocnicze o fenotypie CD4⁺CD8⁻αβ⁺ stanowią główną populację limfocytów TCRαβ⁺ w organizmie płodu. Komórki cytotoksyczne o fenotypie CD4⁺CD8^{lo}αβ⁺ nie są wykrywane aż do 55. dnia ciąży, pojawiają się zwykle od 5 do 8 dni później niż pierwsze limfocyty T pomocnicze. Liczba limfocytów o fenotypie CD4⁺CD8⁺Tαβ⁺ wzrasta znacznie dopiero w okresie neonatalnym. Sinkora i wsp. (21) wykazali, że cytotoksyczne limfocyty T pojawiają się w bardzo małej ilości wprawdzie już w życiu płodowym, jednak liczba ich znacząco wzrasta w okresie poporodowym.

Podsumowując, w procesie ontogenezy limfocytów T u świń potwierdzono występowanie pewnych charakterystycznych właściwości niespotykanych u innych gatunków. Wcześniejsze występowanie komórek Tγδ⁺, najpierw w grasicy, a później na obwodzie podobne jest do sytuacji w tym zakresie obserwowanej u myszy i kurcząt (19), natomiast przeciwne do stwierdzanej u owiec, szczurów i ludzi (2, 5, 10, 12, 13). W późniejszych etapach ontogenezy stosunek limfocytów αβ/γδ u świń zwiększa się stopniowo i w efekcie limfocyty αβ stają się dominującą subpopulacją zarówno w grasicy, jak i na obwodzie (21), podobnie jak to ma miejsce u innych gatunków zwierząt. Jednak u świń pod koniec ciąży dochodzi do gwałtownego rozplemu

limfocytów $\gamma\delta$ zarówno we krwi, jak i w obrębie śledziony, co powoduje obniżenie wartości proporcji limfocytów $\alpha\beta$ do $\gamma\delta$ w życiu postnatalnym (21). U ludzi i gryzoni stwierdza się po urodzeniu jedynie niewielką liczbę komórek $\gamma\delta$ w krążącej populacji limfocytów T, w przeciwieństwie do trzody chlewnej (10, 11, 18, 21). Interesujący jest fakt, że większość komórek $\gamma\delta$ we krwi nie wykazuje koekspresji CD8 czy CD2, podczas gdy limfocyty $\gamma\delta$ znajdujące się w śledzionie charakteryzują się obecnością markera CD2 na swojej powierzchni. Być może, CD2 jako cząsteczka adhezyjna powoduje większe powinowactwo komórek T do śledziony, co było sugerowane przez kilku autorów (18, 21, 23).

U świń w odróżnieniu od pozostałych gatunków zwierząt spotyka się stosunkowo dużą liczbę komórek podwójnie pozytywnych $CD4^+CD8^+$. Komórki te są uważane za subpopulację zawierającą limfocyty efektorowe i komórki pamięci będące w stanie spoczynku, a należące do limfocytów T pomocniczych (21). Jak wykazano, w organizmie płodu liczba tych komórek jest stosunkowo niewielka. Pojawiają się sugestie, że ekspresja $CD8^+$ na komórkach $CD4^+$ może być wynikiem ich aktywacji przez różne antygeny, co ma miejsce w życiu postnatalnym. Podobnie, niewielka liczba komórek cytotoksycznych ($CD8^+$) w organizmie płodu może potwierdzać, że kontakt organizmu z antygenami zwiększa liczbę limfocytów $CD8^+$. U ludzi i gryzoni obecność markera CD8 potwierdzono na komórkach NK oraz $TCR\alpha\beta^+$ i $TCR\gamma\delta^+$ po ich aktywacji (11, 14, 21). Biorąc powyższe dane pod uwagę wydaje się, że ekspresja CD8 u wielu gatunków zwierząt, w tym świń, może być indykatorem komórek czynnościowo kompetentnych, które nabyły homodimer CD8 poza grasnicą, po ich aktywacji antygenami (21).

Komórki NK

Komórki NK (natural killer) reprezentują populację szczególnie istotną z punktu widzenia odporności wrodzonej (6). Posiadają one zarówno zdolność spontanicznego ataku komórek zainfekowanych patogenem, jak i produkcji różnego rodzaju cytokin. Jak wykazały dotychczasowe badania, komórki NK mają zdolność lizy komórek zakażonych wirusem oraz mogą odbierać sygnały od innych komórek produkujących cytokiny. Cytokiny indukują wytwarzanie interferonu gamma ($INF-\gamma$) przez komórki NK oraz zwiększają ekspresję receptora dla interleukiny 2 ($IL-2$) na ich powierzchni (6). Między innymi za pośrednictwem komórek NK dochodzi do interakcji pomiędzy odpornością wrodzoną i nabytą. Komórki NK świń zostały po raz pierwszy opisane jako komórki o fenotypie $CD2^+CD4^-CD5^-CD8\alpha^+$. W innych badaniach zidentyfikowano marker CD18, jednak okazało się, że nie występuje on selektywnie na powierzchni tej populacji komórek. Kolejnym antygenem komórek NK o większej specyficzności okazał się marker CD16, jednak,

jak później wykazano, występuje on także na komórkach linii mieloidalnej np. na monocytach (6, 21).

Jak podaje Gerber i wsp. (6), komórki NK świń charakteryzują się fenotypem $CD3^-CD4^-CD5^-CD6^-CD8\alpha^+CD8\beta^-CD11b^+CD16^+$. Według innych autorów, do komórek NK u dorosłych świń zalicza się komórki o fenotypie $CD3\epsilon^-CD2^+CD8^{lo}CD4^-CD5^-CD6^-$ i $SLA-DR^+$ (15, 16, 21, 23). Ich odpowiedniki udało się oznaczyć także u płodów, aczkolwiek nie ustalono, czy stanowią one już dojrzałą funkcjonalnie komórkę NK, czy jedynie jej prekursor (21). Denyer i wsp. (4) definiują komórki NK świń jako $perforinę^+CD2^+CD3^-CD4^-CD5^-CD6^-CD8\alpha^+CD8\beta^-CD11b^+CD16^+$. Ponadto w obrębie populacji komórek NK stwierdza się zarówno komórki MHC II⁻, jak i MHC II⁺. Wydaje się, że ekspresja tego markera jest związana ze stanem czynnościowym komórki i pojawia się po jej aktywacji, podobnie jak to wykazano w przypadku limfocytów T (6).

Komórki o fenotypie charakterystycznym dla komórek NK dojrzałych osobników występują już we wczesnym etapie ontogenezy i są stwierdzane we krwi pępowinowej i śledzionie już w 45. dniu ciąży (ok. 1-2% wszystkich limfocytów) (21). Wykryto je także w węzłach chłonnych krezkowych, jednak w niewielkiej ilości. Liczba komórek NK stabilizuje się u płodu świń na względnie stałym poziomie ok. 70. dnia ciąży i pozostaje niezmienną aż do porodu. Badania wykazały, że w okresie życia płodowego komórki NK nie są aktywne bójczo, pojawianie się ich aktywności w okresie życia postnatalnego jest opóźnione u prosiąt pozbawionych stymulacji antygenowej (germ-free). Może to wskazywać, że w okresie życia płodowego osiągają one jedynie pewien stopień dojrzałości, a do pełnego rozwoju ich funkcji bójczych niezbędny wydaje się kontakt z mikroflorą. Podczas rozwoju wewnątrzmacicznego obserwuje się dwa okresy, w których dochodzi do znaczącego wzrostu liczby komórek NK – około 70. dnia ciąży oraz tuż przed porodem (21). W okresie postnatalnym komórki NK stanowią około 15% limfocytów we krwi obwodowej i w śledzionie, w węzłach chłonnych krezkowych stanowią ok. 3% limfocytów. U ludzi czynnościowo kompetentne komórki NK były izolowane z wątroby i śledziony już w bardzo wczesnych stadiach ontogenezy (17, 22). Ich aktywność bójcza była jednak niższa niż u osobników dojrzałych. Aktywność cytolityczna komórek NK płodu i noworodka u świń jest także bardzo niska, co może sugerować, że istnieją różnice pomiędzy komórkami NK płodowymi a występującymi u osobników dorosłych.

Najbardziej dynamiczny rozwój obwodowego układu limfatycznego świń ma miejsce pomiędzy 60. a 90. dniem ciąży. Jednak dopiero po porodzie dochodzi do rozprzestrzenienia się limfocytów do wtórnych narządów limfatycznych, a stopień tego procesu wydaje się zależny od kolonizacji przewodu pokarmowego oraz wzmacniany przez kontakt noworodka z drobnoustrojami środowiskowymi.

Podsumowując przedstawione dane na temat prenatalnego rozwoju układu immunologicznego, należy mieć na uwadze, że nowo narodzone prosię różni się rozwojem układu odpornościowego od osobnika dorosłego nie tylko pod względem morfologicznym, ale przede wszystkim niedojrzałością funkcjonalną wielu elementów limfatycznych.

Piśmiennictwo

1. Buczek J., Deptuła W., Gliński Z., Jarosz J., Stosik M., Wernicki A.: Immunologia porównawcza i rozwojowa zwierząt. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa-Poznań 1999.
2. Campana D., Janossy G., Coustain-Smith E., Amlot P. L., Tian W. T., Ip S., Wong L.: The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in men. *J. Immunol.* 1989, 142, 57-66.
3. Cukrowska B., Sinkora J., Mendel I., Splichal I., Bianchi A. T. J., Kovaru F., Tlaskalova-Hogenova H.: Thymic B cells of pigs fetuses and germ-free pigs spontaneously produce IgM, IgG and IgA; detection by ELISPOT method. *Immunology* 1996, 87, 487-492.
4. Denyer M. S., Wileman T. E., Stirling C. M., Zuber B., Takamatsu H. H.: Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subset in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T cells, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, 110, 279-292.
5. Edwards J. A., Durant B. M., Jones D. B., Evans P. R., Smith J. L.: Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ i DR to immunoglobulin expression. *J. Immunol.* 1985, 137, 490-497.
6. Gerner W., Kaser T., Saalmuller A.: Porcine T lymphocytes and NK cells-An update. *Develop. Comp. Immunol.* 2009, 33, 310-320.
7. Jan Le C.: Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. *Vet. Res.* 1996, 27, 403-417.
8. Jasiński A., Słomski R., Szalata M., Lipiński D.: Transplantacja narządów – wyzwanie dla biotechnologii. *Biotechnologia* 2006, 72, 7-28.
9. Kovaru F., Kovaru H., Fisar H.: Ontogenetic analysis of some surface markers on pig lymphocytes using fluorescence-activated cell sorter. *Folia Microbiol.* 1985, 30, 277-290.
10. Kuhnlein P., Vicente A., Varas A., Hunig T., Zapata A.: γ/δ T cells in fetal, neonatal, and adult rat lymphoid organs. *Dev. Immunol.* 1995, 4, 181-188.
11. Macdonald H. R., Schreyer M., Howe R. C., Bron C.: Selective expression of CD8 α (Ly-2) subunit on activated thymic γ/δ cells. *Eur. J. Immunol.* 1990, 20, 927-930.
12. Maddox J. F., Mackay C. R., Brandon M. R.: II. An immunohistological study on the development of T lymphocytes in the sheep fetal spleen. *Immunology* 1987, 62, 107-112.
13. Maddox J. F., Mackay C. R., Brandon M. R.: Ontogeny of ovine lymphocytes: I. An immunohistological study on the development of T Lymphocytes in sheep embryo and fetal thymus: ontogeny of ovine lymphocytes. *Immunology* 1987, 62, 97-105.
14. Moebius U., Kober G., Griscelli A. L., Hercend T., Meuer S. C.: Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *Eur. J. Immunol.* 1991, 21, 1793-1800.
15. Pauly T., Weiland E., Hirt W., Dreyer-Bux C., Maurer S., Summerfield A., Saalmüller A.: Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. *Immunology* 1996, 88, 238-246.
16. Pescovitz M. D., Lowman M. A., Sachs D. H.: Expression of T-cell associated antigens by porcine natural killer cells. *Immunology* 1988, 65, 267-271.
17. Philips J. H., Hori T., Nagler A., Bhat N., Spits H., Lanier L. L.: Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytotoxic function and express cytoplasmic CD3 ϵ,δ proteins. *J. Exp. Med.* 1992, 175, 1055-1066.
18. Reddehase M. J., Saalmuller A., Hirt W.: γ/δ T-lymphocyte subsets in swine. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991, 173, 113-117.
19. Sinkora M., Butler J. E.: The ontogeny of the porcine immune system. *Develop. Comp. Immunol.* 2009, 33, 273-283.
20. Sinkora M., Sinkora J., Rehakova Z., Butler J.: Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J. Immunol.* 2000, 165, 1832-1839.
21. Sinkora M., Sinkora J., Rehakova Z., Splichal I., Yangt H.: Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology* 1998, 95, 595-603.
22. Uksila J., Lassila O., Hirvonen T., Toivanen P.: Development of natural killer cell function in the human fetus. *J. Immunol.* 1983, 130, 153-156.
23. Yang H., Parkhouse R. M.: Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996, 89, 76-83.

Adres autora: dr Małgorzata Pomorska-Mól, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: mpomorska@piwet.pulawy.pl