

**A T sejtes immunválasz újszülöttkori jellemzőinek
vizsgálata**

MTA Doktori Értekezés tézisei

Toldi Gergely

Budapest

2021

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. BEVEZETÉS.....	3
2. HÁTTÉR.....	5
2.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban	5
2.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése.....	6
2.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére	7
2.4. Perinatális aszfixia és újszülöttkori stroke.....	8
3. CÉLKITŰZÉS.....	12
3.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban	12
3.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése.....	12
3.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére	13
3.4. Perinatális aszfixia és újszülöttkori stroke.....	13
4. MÓDSZEREK.....	14
4.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban	14
4.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése.....	14
4.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére	15
4.4. Perinatális asphyxia és újszülöttkori stroke	16
5. EREDMÉNYEK	18
5.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban	18
5.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése.....	19
5.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére	22
5.4. Perinatális asphyxia és újszülöttkori stroke	23
6. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	27
6.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban	27
6.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése.....	28
6.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére	28
6.4. Perinatális asphyxia és újszülöttkori stroke	29
7. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	31
7.1. Az értekezés témájához kapcsolódó nemzetközi közlemények.....	31
7.2. Az értekezés témájához kapcsolódó magyar nyelvű közlemény	31
7.3. Tudómanymetriai adatok	32
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	34

1. BEVEZETÉS

Az újszülöttek immunrendszerét az elmúlt évtizedek során leginkább az „éretlen” jelzővel illették a felnőtt immunrendszerrel összehasonlítva. Az újszülöttkor valóban a fertőzések iránti legnagyobb fogékonysággal jellemezhető kor, és a különböző fertőzések az újszülöttkori morbiditás és mortalitás jelentős tényezői világszerte. Klinikusként naponta szembesülök az újszülöttkori fertőzések gyakran súlyos következményeivel, melyek napjainkban is a neonatológia egyik legnagyobb kihívását jelentik. Ugyanakkor a gyulladás számos neonatológiai kórképnek, szövődménynek a kialakulásában is fontos szerepet játszik. Ezek közül némelyek, így például a nekrotizáló enterocolitis vagy a bronchopulmonáris dysplasia elsősorban koraszülötteket érintenek, míg a perinatális aszfixia érett vagy terminustúllépéssel született újszülötteknél gyakoribb. Ahhoz, hogy a fertőzések és egyéb gyulladásos szövődmények által érintett újszülöttek hosszú távú kilátásait érdemben javítani tudjuk, elengedhetetlen az újszülöttkori immunrendszer fejlődésének és működésének pontosabb megismerése.

Tekintettel arra, hogy az ezen vizsgálatokhoz szükséges humán minták rendkívül korlátozott mértékben és mennyiségben állnak rendelkezésre, az immunrendszer korai fejlődésével kapcsolatos tudásunk jelentős része állatkísérletes eredményekből származik, melyek azonban ritkán feleltethetőek meg egy az egyben a humán immunrendszer működésével.

Az ezen a területen az elmúlt években elért eredményeknek köszönhetően az „éretlennek” hit újszülöttkori immunrendszeréről alkotott képünk jelentősen megváltozott. Humán vizsgálatok igazolták, hogy megfelelő in vitro körülmények között az újszülöttek immunsejtjei is képesek a felnőttekével azonos mértékű immunválaszt kiváltani, így az érettség szintje helyett alapvetően a szabályozás eltérő az újszülöttek immunrendszerében. Ez összhangban áll azzal a felismeréssel, hogy újszülöttkorban az immunrendszernek fejlődéstanilag két kihívásnak kell

megfelelnie. Egyrészt meg kell tanulnia felismerni és eliminálni a kórokozókat, másrészt toleranciát kell kialakítani a fejlődő mikrobiom tagjai iránt. Az eltérő szabályozás részletei és a fertőzések iránti nagyobb fogékonyság okai azonban még nem ismertek kellőképpen.

A jelen értekezésben a PhD fokozat megszerzése után folytatott, az újszülöttkori immunrendszerhez kapcsolódó négy vizsgálatom eredményeit foglalom össze. Ezen humán mintákon végzett vizsgálatok során több olyan új, áramlási citométeres mérési protokollt dolgoztam ki, melyek lehetővé tették az újszülöttektől nyert kis mennyiségű vérmintákból való széleskörű információ kinyerését. Az első vizsgálatban azt mutatom be, hogy a fiziológiás, antigén prezentációhoz kötődő kostimulációs útvonalak működése, mely a T sejtek aktivációjának fontos szabályozó eleme, mennyiben tér el újszülöttek esetében felnőttekkel összehasonlítva. Ezt követően azt hasonlítom össze, hogy az újszülött táplálása, különös tekintettel az anyatejes táplálásra, hogyan befolyásolja az immunrendszer, elsősorban a regulátoros T sejt kompartment korai fejlődését. Ezek az eredmények széleskörű nemzetközi médiaérdeklődést váltottak ki, és több országban a napi hírek tárgyát képezték. A harmadik vizsgálat azt mutatja be, hogy a neonatológiában elterjedten használt, ismert immunológiai hatással rendelkező gyógyszerek, így a koffein, a milrinon és a sildenafil, hogy befolyásolják az immunrendszer működését újszülöttkorban. Végül azt mutatom be, hogy a gyulladással járó immunválasz miként járul hozzá két, elsősorban érett újszülötteket érintő kórkép, a perinatális aszfixia és az újszülöttkori stroke patogeneziséhez és lefolyásához.

2. HÁTTÉR

2.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban

Az antigén prezentáció és a kostimuláció elengedhetetlen a megfelelő T sejt működéshez és fontos szerepet játszik az immunválasz szabályozásában. Korábbi irodalmi adatok alapján a kostimulációs molekulák és receptoraik eltérő expressziója magyarázhatja a köldökzsinórvér és felnőtt perifériás vér T limfocitáinak immunológiai reaktivitásában tapasztalt különbségeket. A kostimuláció folyamatában az egyik legfontosabb szerepet az antigénprezentáló sejteken expresszálódó B7 molekulacsalád játssza. Az antigén T sejt receptorhoz (TCR) való kötődésekor a B7-1 (CD80) vagy B7-2 (CD86) fehérje a CD28 receptoron keresztül kostimulációs szignált vált ki, mely a T sejt IL-2 termelését indukálja, ezáltal védelmet biztosít a T sejt számára az apoptózissal, illetve az anergiával szemben. Mind a TCR, mind a CD28 folyamatosan expresszálódik a naiv T sejteken, mely antigén prezentáció esetén lehetővé teszi a T sejt választ. Amennyiben nincs kostimuláció, úgy a TCR-en keresztül létrejött jel a T sejt aktiváció helyett toleranciát indukál az antigénnel szemben. A B7 kostimulációs molekula azonban nemcsak stimuláló, hanem gátló jelzést is közvetíthet a T sejt felé. A TCR stimulációjakor a CTLA-4 (CD154) egy negatív feedback mechanizmus részeként foszforilálódik, melynek hatására a sejtfelszínen stabilizálódik, és a CD28-nál nagyobb affinitással köti a B7 fehérjét, azonban stimuláció helyett gátolja a T sejt IL-2 termelését. A B7 kostimulációs molekula családban a B7-H1 (CD274) is gátló szignált közvetít a T sejt felé a PD-1 receptoron (CD279) keresztül, mely T sejt apoptózist, illetve anergiát okoz. A B7-H2 (CD275), mely az indukálható T sejt kostimulátor (ICOS, CD278) ligandja, elősegíti a T sejt aktivációt és differenciálódást, valamint az effektoros válasz kialakulását. Szemben a CD28 kostimuláló hatásával, az ICOS elsősorban az IL-10 termelését segíti elő, míg nincs hatással az IL-2 termelésre.

Az antigénprezentáló sejteken expresszáldó B7 fehérjék tehát fontos regulátorai a T sejt aktivációnak. A T sejtben létrejövő szignáltranszdukció mellett azonban fontos szerepet játszik az antigénprezentáló sejtekben a B7-1-en, illetve B7-2-n keresztüli visszaható jelátvitel is. Ez elősegíti a lokális immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakulását, függetlenül a kostimulációs molekula T sejtre gyakorolt hatásától. Ennek a folyamatnak a következménye, hogy az antigénprezentáló sejtben upregulálódik a triptofán katabolikus enzim, az indolamin-dioxigenáz (IDO). Ez a potens immunszuppresszív aktivitású enzim először terhességben került felismerésre, mikor az enzim gátlása egerekben megszakította az allogén terhességet. A kinurenin útvonal első lépése során az IDO hatására triptofánból (TRP) kinurenin (KYN) képződik. A KYN a továbbiakban különböző enzimek közreműködésével metabolizálódik. Ezek közül az egyik fontos enzim a kinurenin aminoszferáz, mely a szintén immunszuppresszív hatású kinurénsav (KYNA) képződéséhez vezet. A plazma kinurenin / triptofán koncentráció aránya (K/T hányados) alapján megbecsülhető az enzimikus IDO aktivitás. Mivel a TRP metabolikus útvonal pro-inflammatorikus stimulusokon keresztül aktiválódik, a KYN metabolitok anti-inflammatorikus hatása feedback mechanizmuson keresztül szabályozza az immunválaszt.

2.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése

Az újszülöttkori immunválasz megítélése szempontjából fontos kérdés, hogy hol húzódik a határvonal az immunválasz és az immuntolerancia között az első néhány élethétben. Számos tényezőnek van szerepe abban, hogy a várandósság során ne alakuljon ki alloreaktív immunválasz, és a fejlődő magzatot ne érje immunmediált „kilökődés”. Ezek közé tartozik mind az anyai, mind a magzati regulátoros T sejtek (Treg) számának emelkedése, valamint a magzati dendritikus sejtek emelkedett tolerogén aktivitása. Feltételezhető, hogy ez a szuppresszív jellegű egyensúly a megszületést követően is érvényesül, de jellemzői, valamint

a megszületést követő környezeti hatásoktól, valamint nem öröklött anyai antigénektől (NIMA) való függése nem ismertek.

A bélflóra megszületést követő kialakulása feltételezhetően fontos szerepet játszik az újszülöttkori immunfejlődés szabályozásában. Egyes baktériumtörzsekkel való kolonizáció elősegíti a Treg sejtek fejlődését, míg a dysbiosis megzavarja a sztereotip immunfejlődést, és T sejt aktivációhoz vezet. Az anyai mikrobiom vertikális átvitele a kezdeti, és feltehetően a legjelentősebb meghatározó tényező az újszülöttkori bélflóra kialakulásában. Ebben a tekintetben érdemes megjegyezni, hogy a szülés módja kifejezett jelentőségű, és legalább hét éves korig befolyásolhatja a gyermekkori bélflóra összetételét.

Az újszülött táplálásának módját, mint az újszülöttkori immunválaszt befolyásoló tényezőt eddig szinte alig vizsgálták. Az újszülött táplálásának természetes módja a szoptatás. Az anyatej nem csupán magas tápértékkel bíró molekulákat, hanem immunológiailag aktív komponenseket is tartalmaz. Ezen felül baktériumok és anyai sejtek is megtalálhatóak az anyatejben, így nem meglepő, hogy különbségeket figyelhetünk meg az anyatejjel és a tápszerrel táplált újszülöttek bélflórájának kialakulása között. A bélflóra eltérő összetétele feltehetően közvetett hatással van az újszülött immunfejlődésére, melyet azonban közvetlenül is befolyásolhat az anyatejjel az újszülött szervezetébe kerülő anyai sejteknek való kitettség.

2.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére

A foszfodiészteráz (PDE)-gátlókat, mint a koffeint, milrinont és sildenafilt, széles körben használják a koraszülöttek és érett újszülöttek kezelése során a klinikumban újszülöttkori apnoe, szívelégtelenség és pulmonáris hipertenzió esetén. Az irodalomból ismert, hogy felnőtt vérmintákat vizsgálva és állatkísérletekben ezeknek a hatóanyagoknak kifejezett immunmoduláns hatása van. Nem ismert azonban, hogy milyen hatást gyakorolnak az újszülöttek T sejtjeinek működésére.

A koffein non-szelektív PDE-gátló és aspecifikus adenosin receptor (AR) antagonist. A neonatológiában a fő indikációja a koraszülöttek apnoéjának kezelése a 34. gesztációs hét előtt. A koffein terápiás plazmaszintje koraszülöttekben 25-125 uM között van, ami az átlagos mennyiségű (napi 1-4 csésze) kávé fogyasztó felnőtt plazmaszintjének (13-25 uM) többszöröse. Ebben a koncentráció tartományban a koffein gátolja az agytörzsi A1 és A2A AR-k működését, és ezáltal stimulálja a légzőközpontot. A PDE-gátlás növeli, míg az AR-gátlás csökkenti a cAMP szintet. Előbbi anti-inflammatorikus, utóbbi pedig pro-inflammatorikus hatással társul. A koffein az intracelluláris kalcium homeosztázist is két ellentétes irányban befolyásolhatja. Egyrészt az inozitol triszfoszfát (IP3) gátlásán keresztül csökkenti a kalcium kiáramlását az endoplazmás retikulumból (ER). Másfelől aktiválja a ryanodin receptort, ami növeli a kalciumkiáramlást az ER-ből, és hozzájárul az extracelluláris kalcium beáramlásához, további citoplazmatikus kalciumszint-növekedést okozva, mely kulcsfontosságú a T sejtek aktivációja és a citokintermelés során. Felnőtt mintákban a koffein fő hatása a T sejt proliferáció gátlása és a TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 és IL-10 citokinek, valamint az antitestek termelésének csökkentése.

A milrinon, mely a PDE3 specifikus gátlószere, gyakran használatos szívelégtelenségben, mert növeli a szív pumpafunkcióját, a perifériás értónust azonban csökkenti, ezáltal vérnyomáscsökkenést okozhat. A sildenafil a PDE5 specifikus gátlószere, neonatológiában a pulmonáris hipertenzió kezelésében alkalmazzák. A PDE ezen altípusainak gátlása nem csupán a cAMP, de a cGMP szintet is emeli, mely összességében immunuszuppresszív hatást eredményez.

2.4. Perinatális aszfixia és újszülöttkori stroke

A perinatális aszfixia a vajúdas illetve a szülés alatt bekövetkezett súlyos perfúziós zavar és a következményes oxigénhiányos állapot eredménye. Az oxigénhiány következtében központi

idegrendszeri (KIR) sérülés alakul ki, amelyet hypoxiás ischémiás encephalopathiának (HIE) neveznek. Az aszfixia elsősorban az érett illetve a terminuson túli újszülötteket fenyegeti. Incidenciája 2-4/1000 élveszülés, azonban az újszülöttkori halálozások 23 %-áért felelős világszerte. A gyermekek egy részénél kedvező neurológiai kimenetel várható, azonban még mindig jelentős hányad esetében alakul ki komoly neurológiai szövődmény, melyek közül a mentális retardáció, a cerebrális parézis és a görcsök a leggyakoribbak. A neurológiai kimenetel tekintetében tehát igen jelentős az egyéni variabilitás, ezért kulcsfontosságú a lehetséges prediktív faktorok azonosítása.

Az utóbbi évek kutatási eredményeinek köszönhetően elfogadottá vált, hogy a KIR gyulladása, azaz a neuroinflammáció minden neurológiai károsodásra jellemző, így a perinatális aszfixiához kötötten bekövetkező károsodásokra is. A sérülés nyomán aktiválódó mikroglia és astrocyták pro-inflammatorikus citokineket és kemokineket bocsátanak ki. A vér-agy gát sérülése következtében nagyszámú perifériás immunsejt vándorol a KIR-be, ezzel eszkalálva a gyulladást, további idegszöveti károsodást és neurális apoptózist létrehozva. A hypoxiás károsodásra adott gyulladást azonban nem korlátozódik a KIR-re, hanem szisztémásan zajlik, így a periférián keringő immunsejtek fokozott citokintermelése is kimutatható. Aszfixia során a gyulladást szabályozásában központi szerepet játszanak a KIR-ben és a periférián is a T limfociták. E sejtek neurotoxicitása a perforin és granzim B termelésén, reaktív szabadgyökök felszabadításán, a neuronsejtek apoptózisának indukálásán és legfőképpen a pro- és anti-inflammatorikus citokinek termelésén keresztül érvényesül.

Igen kiterjedt kutatási eredmények támasztják alá a gyulladást káros következményeit, azonban az utóbbi évtized számos vizsgálata jelzi azt, hogy a gyulladást van egy másik aspektusa is. Bizonyos mértékű gyulladást pozitívan befolyásolja a neurológiai végekimenetelt. A neuronális gyulladást előnyei között szerepel a neuroprotekción, a regenerációhoz szükséges idegi prekurzorok mobilizálása, a remyelinizáció és az

axonregeneráció. A neurogenesisben bizonyos citokinek is fontosak. A toxikus hatása mellett a TNF- α elősegíti a neuronális progenitor sejtek proliferációját, a sejtvonal elköteleződést és a differenciációt. Az IL-1-nek szintén ismert a neurotrófikus hatása, amely feltehetően az idegi növekedési faktor termelésének fokozásán keresztül érvényesül. Az IL-1 és a TNF- α direkt módon agyszövetbe történő juttatásával astrogliosiszt és angiogenezist tudtak kiváltani. A TGF- β családba potens immunszabályozó fehérjék tartoznak, amelyek szintén fontos szerepet játszhatnak az idegsejtek fejlődésében, reparációjában és túlélésében.

Korábbi aszfixiában folytatott kutatások alapján úgy tűnik, hogy az IL-1 β , a TNF- α és az IFN- γ idegszövet-károsító hatása a legkiemelkedőbb. Az IL-6, IL-8, és IL-17 szintén fontos elemei lehetnek a gyulladásos válasznak. Ezzel szemben az anti-inflammatorikus TGF- β -nak és IL-10-nek védő szerepe lehet. A mérsékelt hipotermia igazoltan javítja a neurológiai kimenetelt és mára az elfogadott terápiás protokoll része lett HIE-ban szenvedő érett újszülöttek körében. A hipotermia a neuroprotektív hatását többek között a szisztémás gyulladás mértékének csökkentésén keresztül fejti ki.

A vér-agy gát permeabilitása eleve magasabb újszülöttekben, mint felnőttekben, a hipoxiás sérülés pedig tovább fokozza azt. Az IL-1 β , TNF- α és IFN- γ szintén fokozzák a vér-agy gát permeabilitását. A CD49d a VLA-4 antigén egy része, amely az aktivált leukociták migrációjáért felelős. Az endothel sejtek által expresszált VCAM-1-hez kötődik, elősegítve az aktivált leukociták kilépését a sérült szövetbe. Habár a VCAM-1 nem kizárólag a KIR-ben expresszálódik, a CD49d expressziója mégis jól korrelál a T sejtek azon képességével, hogy belépjenek a gyulladás helyszínére, különösen a neuroinflammáció által érintett agyszövetbe.

A perinatális aszfixia terápiájában a legnagyobb kihívás az, hogy a gyulladásos válasz jótékony, KIR regenerációt elősegítő hatásait kihasználjuk a káros hatások minimalizálása mellett. A hátrányos hatásokkal ellentétben azonban a gyulladás előnyös hatásairól igen korlátozott az ismeretünk. A gyulladásos válasz lefolyásának pontos jellemzése, az enyhe és

súlyos HIE közötti immunológiai eltérések megértése és a neuroinflammáció és neurológiai kimenetel közötti összefüggések feltérképezése fontos, a klinikum terén is hasznosítható ismeretekkel szolgálhat.

A perinatális időszak során a legnagyobb a stroke rizikója egész gyermekkorban. A neonatális artériás ischémiás stroke (NAIS) definíció szerint egy, az újszülöttkorban diagnosztizált artériás ischémiás stroke, amely a klinikai tünetek mellett radiológiai vizsgálattal is megerősítésre került. A NAIS az élethosszig tartó finom motoros károsodástól a féloldali bénulásig terjedő motoros, a kognitív és a viselkedési zavarok egyik vezető oka. A NAIS esetek többnyire nem kerülnek időben felismerésre a prenatális kezdet és az aspecifikus tünettán miatt, így az intervenciós lehetőségek elsősorban a prevencióra és az inzultust követő gyulladásozó folyamat mérséklésére korlátozódnak. A NAIS diagnosztizálását tovább nehezíti az a tény, hogy a rizikótényezők és a klinikum jelentős átfedést mutatnak a HIE-vel és a kettő együttes fennállása is gyakori. A két kórkép elkülönítése komplex kérdés, különösen, mivel a neuroinflammáció mindkettő sajátossága.

3. CÉLKITŰZÉS

3.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban

1. Célunk volt, hogy áramlási citometria segítségével meghatározzuk a B7-1, B7-2, B7-H1 és B7-H2 kostimulációs molekulákat expresszáló aktivált CD11b+ monociták, valamint az ezeknek megfelelő receptorokat (úgy mint CD28, CTLA-4, PD-1 és ICOS) expresszáló T sejtek és CD4 sejtek prevalenciáját köldökzsinórvérben és felnőtt perifériás vérben.
2. Célunk volt, hogy ezen mintákban meghatározzuk az IDO intracelluláris expresszióját áramlási citometriával, továbbá a plazma kinurenin, kinurénsav és triptofán szintjeit nagyteljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) segítségével.

3.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése

3. Célunk volt megállapítani, hogy hogyan fejlődik a T sejtek immunfenotípusa megszületés és a harmadik élethét között anyatejjel és tápszerrel táplált újszülöttekben, különös tekintettel a regulátoros T sejtekre.
4. Célunk volt megvizsgálni az újszülött és az anyai immunrendszer egymásra hatását megszületés és a harmadik élethét között anyatejjel és tápszerrel táplált újszülöttek esetén vegyes limfocita reakciók segítségével.
5. Célunk volt tanulmányozni a fejlődő bélflóra összetételét az első három élethétben a táplálás módja és a T sejt immunfenotípus viszonylatában.

3.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére

6. Célunk volt a koffein, milrinon és sildenafil hatásának vizsgálata felnőtt perifériás vérből és köldökzsinórvérből izolált T sejtek aktivációjára.
7. Célunk volt a koffein, milrinon és sildenafil hatásának vizsgálata felnőtt perifériás vérből és köldökzsinórvérből izolált T sejtek citokintermelésére.
8. Célunk volt a felnőtt perifériás vérből és köldökzsinórvérből izolált T sejtek egy, a cAMP lebontásában szerepet játszó ektoenzim, a CD203c expressziójának vizsgálata.
9. Célunk volt a felnőtt perifériás vérből és köldökzsinórvérből izolált T sejtek egy, a T sejtek citokintermelésében kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor, a nuclear factor of activated T cells (NFAT) expressziójának vizsgálata.

3.4. Perinatális aszfixia és újszülöttkori stroke

10. Célunk volt a T limfociták prevalenciájának és citokin termelésének a jellemzése enyhe és súlyos perinatális aszfixiában a gyulladáshoz vezető válaszban azon szereplőinek azonosítása érdekében, amelyek meghatározóak lehetnek a neurológiai kimenetel szempontjából.
11. Célunk volt a plazma citokinszintek változásainak jellemzése enyhe és súlyos perinatális aszfixiában a hipoxiás eseményt követően egy hónapos életkorig.
12. Célunk volt a plazma TRP, KYN és KYNA szintek változásainak, valamint a plazmaIDO aktivitásának jellemzése enyhe és súlyos perinatális aszfixiában a hipoxiás eseményt követően egy hónapos életkorig.
13. Célunk volt a T limfociták prevalenciájának és citokin termelésének a jellemzése újszülöttkori stroke-ban perinatális aszfixiával összehasonlítva az első élethónapban.
14. Célunk volt a plazma citokinszintek jellemzése újszülöttkori stroke-ban perinatális aszfixiával összehasonlítva az első élethónapban.

4. MÓDSZEREK

4.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban

Vizsgálatainkhoz 20 egészséges felnőttől vettünk perifériás vérmintát, valamint 17 egészséges, érett újszülöttől gyűjtöttünk köldökzsinórvért közvetlenül a megszületést követően. A mononukleáris sejteket izolálás után a következő konjugált anti-humán monoklonális antitest-kombinációkkal, a gyártó javaslatainak megfelelően jelöltük külön csövekben: CD3, CD4, CD28, CD152 (CTLA-4), CD278 (ICOS) és CD279 (PD-1), vagy CD3, CD11b, CD80 (B7-1) és CD275 (B7-H2), vagy CD3, CD11b, CD86 (B7-2) és CD274 (B7-H1). Permeabilizációt követően a sejteket egér anti-humán IDO monoklonális antitesttel inkubáltuk majd FITC-vel jelölt kecske anti-egér antitesttel jelöltük. Mosást követően a sejteket BD FACSAria áramlási citométerrel vizsgáltuk. A FITC-vel jelölt kecske anti-egér specifikus festés izotípus kontrollja céljából a mononukleáris sejteket sejtfelszíni antitestekkel és FITC-vel jelölt kecske anti-egér antitestekkel inkubáltuk mintánként külön csőben, egér anti-humán IDO monoklonális antitestek hozzáadása nélkül.

A vérmintákból izolált plazmát fagyasztva tároltuk, majd a TRP, KYN és KYNA koncentrációt HPLC segítségével, a Herve és mtsai. által leírt, némileg módosított módszer alapján, Agilent 1100 HPLC rendszeren állapítottuk meg.

4.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése

38 elektív császármetszéssel született, érett, egészséges újszülöttet vontunk be a vizsgálatba. Közülük az első három élethétben 16-an kaptak kizárólag anyatejet, 13-an kizárólag tápszert, és 9-en vegyes táplálást. A császármetszés előtt perifériás anyai vérmintát vettünk, majd a császármetszés során köldökzsinórvért gyűjtöttünk. Az újszülöttektől három hetes életkorban

perifériás vérmintát vettünk kizárólag kutatási célra. Az újszülöttek egy részétől megszületés után közvetlenül és három hetes korban székletmintát is gyűjtöttünk.

A mononukleáris sejtek izolálását követően a minták egy részét immunfenotipizálásra használtuk két panelben. Az első panelben a sejteket PMA, ionomycin és monensin kombinációjával stimuláltuk, majd CD3, CD4, CD8, CD107a és intracelluláris IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8 és IL-17A elleni monoklonális antitestekkel jelöltük. A második panelben CD3, CD4, CD25, CD31, CD45RA, CD69, HLA-DR és FoxP3 jelölést végeztünk. A mintákat BD LSRII áramlási citométeren mértük.

A minták másik részét vegyes limfocita reakciókhoz (MLR) használtuk. A mágneses módszerrel izolált újszülött T sejteket irradiált anyai mononukleáris sejtekkel stimuláltuk öt napon keresztül. A kísérleteket fordítva, azaz irradiált újszülött mononukleáris sejteket használva az anyai T sejtek stimulálására is elvégeztük. A minták egy részéből mágneses módszerrel depletáltuk a CD25⁺ sejteket. A sejtproliferáció mértékét áramlási citometria segítségével állapítottuk meg a CD3, CD4 és CD8 sejtekben.

A vegyes limfocita reakciók során a felülúszókban vizsgáltuk a T sejtek citokintermelését is Bio-Plex Pro Assay szendvics ELISA elven működő immunoassay segítségével. Ezen mérések során az IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 és TNF- α citokinek koncentrációját elemeztük. Az újszülöttektől gyűjtött székletmintákból kivontuk a bakteriális DNS-t és amplifikáltuk a 16S rRNS-t kódoló géneket. A megszületést követően vett meconiumból nem sikerült további analízisre elegendő mennyiségű DNS-t kivonni. A génszekvenálást Illumina MiSeq platformon végeztük.

4.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére

10 egészséges felnőttől gyűjtöttünk perifériás vért, 6 érett, egészséges újszülöttől pedig köldökzsinórvért. Az egészséges felnőttek és a szülők a vérvétel előtt legalább 72 órán át

tartózkodtak a PDE-gátlók fogyasztásától. A mononukleáris sejtek izolálása után többféle kísérletet végeztük a mintákon. A sejtek egy részét kinetikus mérésekhez használtuk fel. Ezeket a mintákat az alábbi szerekkel inkubáltuk: koffein (50 μM), milrinon (30 μM), sildenafil (30 μM), dbcAMP (szintetikus cAMP analóg, 100 μM) vagy ZM241385 (specifikus A2A AR inhibitor, 10 μM). Kontrollként kezeletlen mintát is mértünk. A sejteket CD4 sejtfelszíni receptorral jelöltük, majd feltöltöttük kalciumszenzitív Fluo-4 és a reaktív oxigéngyököket (ROS) kötő dihidroethidium festékekkel. A mintákat FACS Aria áramlási citométeren mértük. Az alapvonal felvétele után fitohemagglutinin (PHA) hozzáadásával aktiváltuk a sejteket, majd 10 percen keresztül mértük a kalciumbeáramlást és a ROS képződést. A méréseket saját fejlesztésű, FacsKin nevű szoftverünkkel értékeltük.

A sejtek egy további részében az intracelluláris citokineket vizsgáltuk. A mintákat az alábbi szerekkel inkubáltuk: koffein (50 μM), milrinon (30 μM) vagy sildenafil (30 μM). Kontrollként kezeletlen mintát is mértünk. A citokintermelést PMA, ionomycin és brefeldin A hozzáadásával stimuláltuk. Sejtfelszíni CD4 jelölést követően az alábbi citokinekre specifikus antitestekkel jelöltük intracellulárisan a sejteket: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17. Ezt követően FACS Aria áramlási citométeren mértük a mintákat.

Végül a sejtek maradékában a CD203c és NFAT expressziót jellemeztük. A mintákat az alábbi sejtfelszíni markerekkel jelöltük: CD4, CD8, CXCR3 (Th1 sejtek markere), CCR4 (Th2 sejtek markere), CD203c. Permeabilizációt követően anti-NFATc1 antitest jelölést végeztünk. A mintákat FACS Aria áramlási citométeren mértük.

4.4. Perinatális asphyxia és újszülöttkori stroke

Vizsgálatunkba 33 érett újszülöttet vontunk be, akik perinatális aszfixia iránydiagnózissal 72 órán keresztül protokoll szerinti teljesest hipotermiában részesültek. Az újszülöttektől a

diagnosztikus vérvételekhez kapcsolódóan a hűtés kezdetekor (3-6 órás életkorban), valamint 24 és 72 órás, illetve egy hetes és egy hónapos életkorban vettünk vérmintákat.

A vizsgálatból peroxisomális tárolási betegség miatt egy újszülött kizárásra került. Négy újszülött esetében a koponya MRI felvétel újszülöttkori stroke-ot diagnosztizált, az ő adataikat külön elemeztük. Perinatális aszfixia diagnózisával összesen 28 újszülött adatait elemeztük két csoportban. A koponya MRI lelet és az amplitúdó integrált EEG-n észlelt eltérések alapján 11 újszülött a súlyos, 17 az enyhe-közepes csoportba került.

A mononukleáris sejteket PMA, ionomycin és BFA kombinációjával stimuláltuk, majd permeabilizálást követően CD4, CD8, CD49d, IL-6, IL-17A, IL-10, IFN- γ , TNF- α , FoxP3, TGF- β és IL-1 β elleni monoklonális antitestekkel jelöltük két panelben. A mintákat BD FACS Aria áramlási citométeren mértük.

A plazmában Bio-Plex Pro Assay szendvics ELISA elven működő immunoassay segítségével az alábbi citokinek koncentrációját vizsgáltuk: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1b és VCAM.

A plazmamintákból TRP, KYN és KYNA koncentrációt nagyteljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) segítségével, a Herve és mtsai. által leírt, némileg módosított módszer alapján, Agilent 1100 HPLC rendszeren állapítottuk meg.

5. EREDMÉNYEK

5.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban

Köldökszinórvérben statisztikailag szignifikáns, de biológiailag szerény csökkenést tapasztaltunk a CD4⁺ CD28⁺ limfociták gyakoriságában felnőtt perifériás vérhez képest. Ugyanakkor jelentősen emelkedett a CD152 szabályozó receptor (CLTA-4) expressziója ezeken a sejteken. A CD11b⁺ CD86⁺ monociták előfordulása gyakoribb volt köldökszinórvérben, mint felnőtt perifériás vérben. A CD3⁺ CD278⁺ limfociták előfordulási gyakorisága szintén magasabb volt köldökszinórvérben felnőtt perifériás vérhez képest, bár ez a különbség nem volt szignifikáns a CD4⁺ alcsoport esetében. A megfelelő kostimuláló molekula, a CD275 előfordulása a CD11b⁺ monocitákon hasonló volt a két csoportban. Ezzel szemben a CD11b⁺ CD274⁺ monociták, melyek gátló jelzést közvetítenek a CD279-en keresztül, alacsonyabb gyakorisággal voltak detektálhatóak köldökszinórvérben szemben a felnőtt perifériás vérrel.

Köldökszinórvérben emelkedő tendenciájú előfordulási gyakoriságot figyeltünk meg az IDO-t expresszáló CD3⁺ limfociták tekintetében, összehasonlítva a felnőtt perifériás vérrel ($p = 0,069$). A CD11b⁺ alcsoport esetében az IDO-t expresszáló sejtek azonos mennyiségben fordultak elő. Az átlagos fluoreszcens intenzitás (MFI) értéke IDO-ra nézve alacsonyabb volt köldökszinórvérben szemben a felnőtt perifériás vérrel, mind CD3⁺ limfociták, mind CD11b⁺ monociták esetében. A CD80-on és CD86-on keresztüli visszaható jelátvitel jelenlétét korrelációs analízis segítségével vizsgáltuk. Ellentétes összefüggést találtunk a CD11b⁺ CD86⁺ monociták és az IDO-t expresszáló CD11b⁺ monociták között köldökszinórvérben ($r = -0,59$), míg nem volt korreláció felnőtt perifériás vérben. Továbbá pozitív összefüggést találtunk felnőtt perifériás vér CD3⁺ sejtjeinek IDO MFI értéke és a CD11b⁺ CD80⁺ monociták prevalenciája között ($r = 0,48$).

A KYN plazmaszintjében kifejezett emelkedést láttunk köldökzsinórvérben, ami több mint kétszeres KYN / TRP arányt eredményezett szemben a felnőtt perifériás vérrel. A KYNA szintje szintén jelentősen, majdnem tízszer magasabb volt köldökzsinórvérben.

5.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése

A CD3⁺ sejtek aránya alacsonyabb volt köldökzsinórvérben az anyai vérmintákkal összehasonlítva, míg a CD4⁺ sejteké majdnem kétszer magasabb volt. A CD8⁺ sejtek aránya mintegy a fele volt az újszülöttkori mintákban az anyai és kontroll nem terhes felnőtt mintákhoz képest. A CD4⁺ FoxP3⁺ CD25^{hi} Treg sejtek aránya az első három élethétben 6,4%-ról 8%-ra emelkedett, mely a nem terhes felnőtt mintákkal összevethető szint, de alacsonyabb az anyai (harmadik trimeszter végi) aránynál. Az egyes táplálási csoportok esetén három hetes életkorban majdnem kétszeres különbség volt megfigyelhető (9,3% vs 4,9%) az anyatejvel táplált újszülöttek esetén a kizárólag tápszerrel tápláltakhoz képest. Megvizsgáltuk bizonyos sejtfelszíni markerek előfordulási gyakoriságát a Treg sejteken megszületéskor és három hetes életkorban. A HLA-DR expressziója emelkedést mutatott, mely a Treg sejtek aktivációját tükrözi, azonban a CD45RA, CD31 és CD69 markerek esetében nem volt különbség. Érdekes módon az egyes táplálási csoportok között sem figyeltünk meg különbséget ezen markerek esetében.

Ezt követően a stimulált T sejtek funkcionális aktivitását vizsgáltuk a citokintermelés és a CD8⁺ sejtek CD107a expressziójának jellemzésével, mely a degranuláció markere. A CD4⁺ IL-8⁺ sejtek előfordulása alacsonyabb, míg a CD4⁺ IFN- γ ⁺ sejteké magasabb volt az anyai mintákban az újszülöttekhez képest. A CD4⁺ és CD8⁺ sejtek IFN- γ , IL-4, IL-6 és IL-8 expressziója tekintetében nem volt különbség megszületéskor és három hetes életkorban. A CD8⁺ IL-17⁺ pozitív sejtek száma, valamint a CD4⁺ és CD8⁺ sejtekben az IL-17 MFI értéke azonban növekedést mutat az első három élethétben. Érdekes módon a CD4⁺ és CD8⁺

sejtekben az IFN- γ MFI értéke három hetes életkorban majdnem háromszor magasabb volt a kizárólag tápszerrel táplált újszülöttek esetén az anyatejjel tápláltakhoz viszonyítva.

A CD8⁺ sejtek nagyobb arányban expresszálták a CD107a degranulációs markert nem terhes felnőtt mintákban az újszülöttekhez képest. A marker MFI értéke CD8⁺ sejteken szintén magasabb volt. Az egyes táplálási csoportok között ebben a tekintetben nem volt különbség.

MLR vizsgálatot 37 anya – újszülött páros mintáin végeztünk. Először az anyai T sejtek proliferációját vizsgáltuk irradiált köldökzsínórvér vagy újszülött mononukleáris sejtek hatására. A CD3⁺ és CD4⁺ pozitív sejtek esetében emelkedett proliferációt észleltünk a három hetes újszülött sejtekre válaszul. Hasonló választ figyeltünk meg abban az esetben is, ha nem terhes felnőttektől származó T sejtek választ vizsgáltuk. Ezt követően fordítva is elvégeztük az MLR vizsgálatokat, az újszülöttek T sejtjeinek proliferációját vizsgálva anyai besugárzott sejtekre válaszul. Érdekes módon ebben az esetben csökkent proliferációt tapasztaltunk a CD3⁺ és CD8⁺, de nem a CD4⁺ sejtek esetében három hetes életkorra a köldökzsínórvér mintákhoz képest.

Három hetes életkorban összehasonlítottuk a különböző táplálási csoportokba tartozó újszülöttektől nyert sejtek proliferációs választ. 16 újszülöttet kizárólag anyatejjel, 13-at kizárólag tápszerrel, 8-at vegyesen tápláltak. A CD3⁺ sejtek proliferációjának csökkenése három hetes életkorra továbbra is tapasztalható volt a kizárólag anyatejjel táplált újszülöttek esetén, de nem volt megfigyelhető a másik két csoportban. Hasonló mintázatot láttunk a CD4⁺ és CD8⁺ sejtek esetében is. Meglepő eredmény volt, hogy a kizárólag anyatejjel táplált újszülöttek esetén nem volt különbség a proliferáció mértékében egyik vizsgált sejtcsoport esetén sem megszületés és három hetes életkor között abban az esetben, ha stimulátorként nem terhes felnőttől származó sejteket használtunk, mely azt mutatja, hogy a kialakuló tolerancia specifikus az anyai antigénekre.

Ezt követően azt kívántuk megállapítani, hogy a NIMA iránti tolerancia Treg függő-e. E célból megismételtük az MLR vizsgálatot hat olyan anya – újszülött páros mintáival, ahol az újszülött kizárólag anyatejes táplálásban részesült. A megismételt vizsgálatban azonban mágneses módszerrel depletáltuk a CD25+ sejteket. Ismert, hogy várandósság során emelkedik a Treg sejtszám. Ennek megfelelően az anyai CD3+ sejtek proliferációja emelkedett mind köldökzsínórvérből, mind három hetes korban nyert vérmintából származó sejtekkel való stimulációkor Treg depléciót követően. Ugyanez a mintázat megfigyelhető volt CD4+ sejtek esetén is, CD8+ sejtek esetén azonban nem.

A háromhetes korban vett újszülött CD3+ T sejtek proliferációja szintén emelkedett Treg depléciót követően, ez azonban nem volt megfigyelhető köldökzsínórvérből származó sejtek esetén. Hasonló mintázatot láttunk CD4+ sejtek esetén, CD8+ sejtek esetén azonban nem.

Kizárólag anyatejjel táplált újszülöttek esetén vizsgáltuk a T sejtek által termelt citokinek mennyiségét MLR során a felülúszóban. Az IFN- γ és a TNF- α koncentrációja alacsonyabb volt három hetes korban, mint köldökzsínórvér sejteket vizsgálva, a többi citokin esetében (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17) azonban nem volt különbség. A maximális citokintermelő kapacitás, melyet CD3/CD28 aktivátor gyöngyökkel való inkubálással vizsgáltunk, mind IFN- γ , mind TNF- α esetében magasabb volt, mint az anyai sejtekre adott válasz részeként köldökzsínórból és három hetes korban vett sejtek esetében is. Úgy tűnik tehát, hogy az anyatejes táplálás csökkenti a Th1 citokin választ az újszülött T sejtjeiben anyai antigén stimulust követően.

Szintén vizsgáltuk az anyatejes táplálás hatását a kialakuló bélflóra összetételére három hetes életkorban. A kizárólag anyatejjel és kizárólag tápszerrel táplált újszülötteket összehasonlítva a mikrobiom összetétele nagyrészt megegyező volt. Nem volt különbség alfa és béta diverzitás tekintetében a két csoport között. Főkomponens-analízis kapcsán a két táplálási csoport tagjai közel helyezkedtek el egymáshoz, és az anyatejes táplálás a Gemella nemzetséggel mutatott összefüggést. Lineáris diszkriminancia-analízis a Gemella és Veillonella nemzetségek

dúsulását jelezte az anyatejes újszülöttek mintáiban. Random Forest vizsgálat a Staphylococcusok, majd ezt követően a Gemellák jelenlétét írta le legjelentősebb tényezőként, mely a két táplálási csoportot megkülönbözteti.

Végezetül integratív módon, hálózatosan elemeztük fenotípus, MLR és mikrobiom adatainkat három hetes életkorban, külön a kizárólag anyatejjel táplált, és külön a kizárólag tápszerrel táplált újszülöttek csoportjában. Az elemzés számos pozitív és negatív korrelációt írt le az egyes vizsgált paraméterek között. Anyatejes újszülöttek esetén a CD4⁺ és CD8⁺ sejtek anyai antigénhatásra történő proliferációja erősen korrelált a Gemella nemzetségnek és a bőrflóra egyes elemeinek jelenlétével. A Veillonella nemzetség tagjainak jelenléte erősen korrelált a perifériás Treg sejtszámmal, a táplálás módjától függetlenül. Anyatejes újszülöttekben a Veillonellák szintén korreláltak a CD4⁺ sejtek HLA-DR expressziójával és a CD8⁺ sejtek IFN- γ termelésével. Összességében ezek az eredmények azt sugallják, hogy újszülöttekben a Veillonellák összefüggésben állhatnak a kifejezettebb regulátoros válasszal, míg a bőrflóra tagjai, melyek az anyatejes táplálás során az emlőről juthatnak az újszülött szervezetébe, a T sejtek proliferatív válaszával állhatnak összefüggésben.

5.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére

PHA aktivációt követően a Fluo-4 AUC (görbe alatti terület, mely arányos a beáramló kalcium teljes mennyiségével) és End értéke (mely arányos a beáramló kalcium csúcskoncentrációjával) magasabb volt a ZM241385-tel kezelt felnőtt minták esetében, mint a kezeletlen, koffeinnel vagy sildenafillel kezelt minták esetében. A Fluo-4 AUC értéke magasabb volt a koffeinnel, dbcAMP-vel, milrinonnal, sildenafillel és ZM241385-tel kezelt minták esetében a kontroll mintákhoz képest köldökzsinórvérben. Ez a hatás a koffein és dbcAMP esetében kifejezettebb volt, mint a milrinon, sildenafil és ZM241385 esetében. A Fluo-4 End értéke szintén magasabb volt a koffeinnel és dbcAMP-vel kezelt minták esetében

köldökzsínórvérben a kezeletlen, valamint a milrinonnal, sildenafillel és ZM241385-tel kezelt mintákhoz képest. A Fluo-4 AUC értéke magasabb volt kezeletlen felnőtt mintákban a kezeletlen köldökzsínórvér mintákhoz képest. A dihidroethidium AUC és End értékeit sem felnőtt, sem köldökzsínórvér-minták esetében nem befolyásolta az alkalmazott szerekkel történő kezelés.

A CD4 sejtek intracelluláris IFN- γ termelése alacsonyabb volt köldökzsínórvér, mint felnőtt minták esetében. Az IFN- γ termelő sejtek prevalenciája nem különbözött. A többi vizsgált citokin termelése és az ezeket termelő sejtek prevalenciája szintén nem különbözött. A PDE-gátlók nem befolyásolták az IL-2 termelő CD4 sejtek prevalenciáját felnőtt mintákban, köldökzsínórvérben azonban nőtt e sejtek prevalenciája sildenafillel való kezelést követően. Az intracelluláris termelés mértéke nem változott. A többi vizsgált citokinre a PDE-gátlók nem voltak hatással.

A CD203c sejt felszíni sűrűsége alacsonyabb volt köldökzsínórvérben a felnőtt mintákhoz képest a Th1 és CD8 sejtek esetében. A CD203c sejt felszíni sűrűsége mindkét csoportban magasabb volt Th2, mint Th1 sejteken. A NFAT expressziója alacsonyabb volt köldökzsínórvérben a felnőtt mintákhoz képest a Th1 és CD8 sejtek esetében. Az NFAT expressziója mindkét csoportban magasabb volt Th2, mint Th1 és CD8 sejteken.

5.4. Perinatális asphyxia és újszülöttkori stroke

Az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a CD4+ IL-1 β + sejtek a gyulladással válasz korai fázisában játszanak fontos szerepet, mivel a prevalenciájuk a 6. életóránál magasabb súlyos aszfixia esetén, enyhe aszfixiához képest. Ugyanebben az időpontban az extravazáció aránya is emelkedett ebben a sejtcsoportban, amelyre a CD49d-t expresszáló CD4+ IL-1 β + sejtek csökkent jelenlétéből következtethetünk a perifériás vérben. Így, habár az IL-1 β plazmaszintjében nem tudtunk eltérést kimutatni az enyhe és a súlyos csoport között,

feltételezhetően az IL-1 β fontos szerepet játszik a korai idegszövet károsodás kialakításában a hipoxiás agykárosodást követően. Az IL-1 β intracelluláris szintje (MFI) mindkét csoportban, az enyhe csoportban pedig a plazmaszintje is a 6. életórán a legmagasabb és hasonló mértékben csökkent valamennyi későbbi időpontban, amely szintén ennek a citokinnek a gyulladásos válaszreakció iniciálásában betöltött fontos szerepét támasztja alá.

Az IL-6 plazmaszintje magasabb volt egy hetes korban a súlyos csoportban, mint az enyhe csoportban. Az IL-6 plazmaszintje egy hónapos korra csökkent az enyhe csoportban, míg a súlyos csoportban változatlan maradt. A CD4⁺ IL-6⁺ sejtekben az MFI érték mindkét betegcsoportban 24 óránál érte el a legmagasabb szintet, azt követően pedig csökkent, amely azt jelzi, hogy az IL-6-nak is a korai gyulladásos válaszban van fontos szerepe. A CD8⁺ IL-6⁺ sejtek MFI értéke szintén egy hetes korra csökkent.

CD8⁺ IL-17⁺ sejtek prevalenciája magasabb volt az enyhe csoportban, mint a súlyos csoportban 6 óránál. Ezzel ellentétben, a CD4⁺ IL-17⁺ sejtek prevalenciája alacsonyabb volt az enyhe csoportban, mint a súlyos csoportban egy hetes korban. A súlyos csoportban a CD4⁺ IL-17⁺ sejtek prevalenciája a 6 életórán volt a legalacsonyabb, az összes további időpontban emelkedett volt és egészen egy hónapos korig emelkedett maradt. Az enyhe csoportban a CD8⁺ IL-17⁺ sejtek esetében az MFI érték a 72. életórán volt a legmagasabb. Az IL-17 plazmaszintjében nem találtunk eltérést.

A többi citokinnel ellentétben a TNF- α MFI értéke a CD4 sejtekben a 6. életórát követően mindkét vizsgálati csoportban emelkedett volt. Egy hónapos korban a súlyos csoportban magasabb a TNF- α MFI értéke, mint az enyhe csoportban, amely arra utal, hogy a TNF- α -nak szerepe van az aszfixia hosszútávú következményeinek a kialakításában. A CD49d-expresszáló CD4⁺ TNF- α ⁺ sejtek prevalenciája alacsonyabb súlyos aszfixia esetén a 6. életórán, mint az összes későbbi időpontban, amely azt jelzi, hogy súlyos aszfixia esetén a neuroinflammációban korai fázisában is szerepet játszik, a sejtek fokozott extravazációja révén hozzájárulva az

idegyszövet-destrukcióhoz. Ezt a megállapítást támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a CD49d-expresszázó CD4+ TNF- α + sejtek prevalenciája a súlyos csoportban alacsonyabb 6 óránál és magasabb 72 óránál. A TNF- α plazmaszintjében nem találtunk eltérést.

A CD4+ IFN- γ + sejtek MFI értéke magasabb volt a súlyos, mint az enyhe csoportban 72 óránál. Az MCP-1 plazmaszintje emelkedett volt 24, 72 óránál és egy hetes korban a 6 óras értékhez képest az enyhe csoportban. A G-CSF plazmaszintje magasabb volt a súlyos csoportban az enyhe csoporthoz képest 24 óránál és egy hetes korban. A G-CSF szintje egy hetes korra csökkent és az eredeti károsodást követő emelkedés után egy hónapos korig alacsony maradt az enyhe csoportban.

A CD49d-expresszázó CD4+ TGF- β + sejtek prevalenciája emelkedett volt az enyhe csoportban egy hetes és egy hónapos korban a 72 óras értékhez képest, amely jelzi a TGF- β korai szöveti regenerációban betöltött fontos szerepét. A CD4+ TGF- β + sejtek MFI értéke a 24. életórát követően emelkedett az enyhe csoportban, a súlyos csoportban azonban változatlan maradt, amely a gyulladási folyamat kompenzációjára utal az enyhe csoportban.

Az IL-10 plazmaszintje alacsonyabb volt egy hónapos korban, mint 6 óras és 24 óras korban az enyhe csoportban. Az IL-13 és IL-15 plazmaszintjei emelkedett voltak az enyhe csoportban a súlyos csoporthoz képest 72 óránál. Az IL-13 plazmaszintje magasabb volt 6 és 24 óras korban, mint az azt követő időpontokban a súlyos csoportban.

ROC analízist végeztünk annak a megítélésére, hogy mely paraméterek alkalmasak arra, hogy elkülönítsék az enyhe és a súlyos aszfixiát korai stádiumban. A ROC analízis alapján az CD4+ IL-1 β + sejtek prevalenciája ($p = 0.018$, ROC AUC = 0.784) és a CD4+ IL-1 β + CD49d+ sejtek prevalenciája ($p = 0.027$, ROC AUC = 0.767) a 6. életóránál alkalmas elfogadható szenzitivitás és specificitás mellett az enyhe és a súlyos aszfixia elkülönítésére.

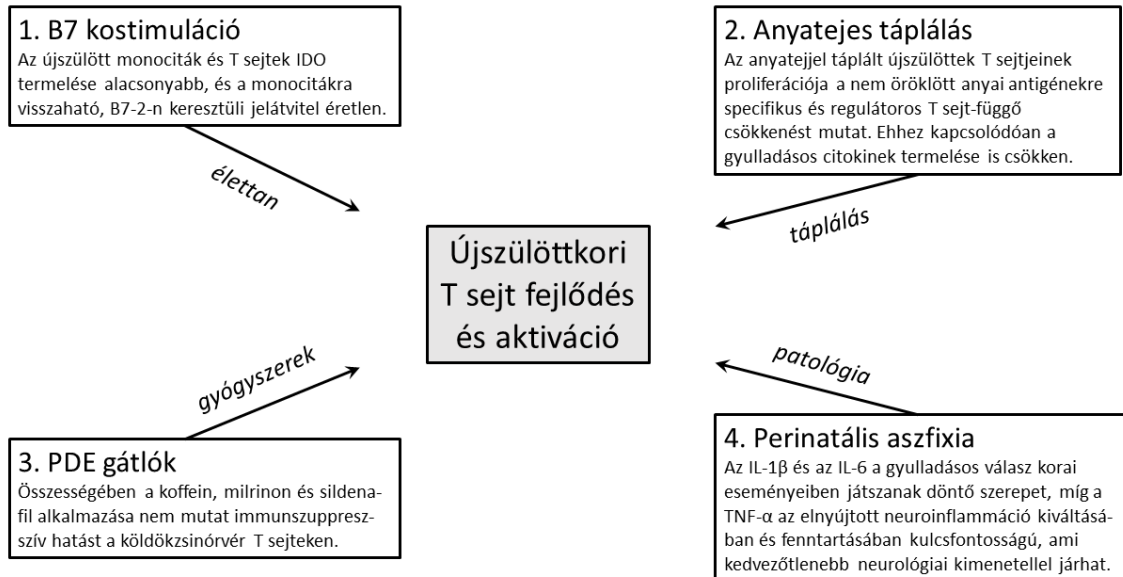
A 6. és 72. életóránál a CD8+ IL-10+ sejtek prevalenciája alacsonyabb volt stroke-ban, mint súlyos aszfixiában. A különbség nem ért el szignifikáns szintet a 24. életóránál. Ezzel szemben

a CD4+ IL-10+ sejtek prevalenciája magasabb volt stroke-ban, mint enyhe aszfixiában a 24. életórán. Egy hetes korban a CD4+ TGF- β + CD49d+ sejtek prevalenciája magasabb volt stroke-ban, mint a két aszfixiás csoportban, valamint stroke-on belül is ebben az időpontban volt a legmagasabb. Ezzel ellentétben egy hónapos korban a CD4+ TGF- β + sejtek prevalenciája alacsonyabb volt stroke-ban, mint aszfixiában.

6 órás korban a CD8+ IL-17+ sejtek prevalenciája magasabb volt stroke-ban, mint súlyos aszfixiában és a CD8+ sejtek több IL-17-et termeltek, mint enyhe aszfixiában. A CD4+ sejtek által termelt IL-1 β mennyisége 6 órás korban volt a legmagasabb, és jelentősen csökkent a 72. életórára. A CD4+ sejtek által termelt IFN- γ mennyisége a 24. életórára érte el a csúcát, és jelentősen csökkent a 72. életórára, amikor is stroke-ban mindkét aszfixiás csoportnál alacsonyabb volt. A CD8+ sejtek által termelt IL-6 mennyisége 72 órás életkorban magasabb volt súlyos aszfixiában, mint stroke-ban. Érdekes módon egy hónapos életkorra ez a mennyiség csökkent mindkét aszfixiás csoportban, azonban emelkedett stroke esetén. A CD4+ vagy CD8+ sejtek IL-1 β és TNF- α expressziójában nem találtunk különbségeket stroke és aszfixia között, bár, amint fentebb bemutattuk, ezeknek a citokineknek fontos szerepük van az aszfixia súlyosságában.

A citokinek plazmaszintjét vizsgálva 72 órás életkorban jelentős gyulladási választ észleltünk stroke esetén, melyet aszfixiához képest emelkedett IL-5, IL-17 és MCP-1 plazmaszint jellemez. A plazma MCP-1 szint 72 órás korban volt a legmagasabb stroke-ban. Egy hónapos korra azonban csökken a gyulladási válasz stroke-ban aszfixiához képest, melyet az IL-4, IL-12 és IL-17 citokinek csökkent plazmaszintje jellemez. Az IL-4 plazmaszintje alacsonyabb volt stroke-ban 72 órás, mint egy hónapos életkorban. A IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL8, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , G-CSF, GM-CSF, MIP-1b és VCAM citokinek plazmaszintjeiben nem találtunk különbséget stroke-ban aszfixiához képest.

6. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA



6.1. B7 kostimuláció újszülöttkorban

1. A köldökzsinórvér CD4⁺ T sejtek CTLA-4 expressziója fokozott, mely a CD28⁺ mediált kostimuláció lehetőségének csökkenésére utal. A CTLA-4-nek megfelelő kostimuláló molekula, a B7-2 szintén emelkedett. Ez a gátló hatás tehát nagyobb mértékben érvényesülhet újszülöttekben, mint felnőttek esetén.
2. A plazmaIDO aktivitása kétszer magasabb köldökzsinórvérben, mint felnőttekben. Az újszülött monociták és T sejtekIDO termelése azonban alacsonyabb, mint a felnőtt sejtéké, és a monocitákra visszaható, B7-2-n keresztüli jelátvitel éretlen. Mindez arra utalhat, hogy a megnövekedettIDO aktivitás inkább placentáris, mintsem magzati eredetű lehet.

6.2. Anyatejes táplálás és az immunválasz fejlődése

3. A regulátoros T sejtek mennyisége emelkedik az első három élethétben, és ez a sejttípus majdnem kétszeres számban van jelen a kizárólag anyatejjel táplált újszülöttekben, mint a kizárólag tápszerrel tápláltakban. A Th17 sejtek mennyisége szintén emelkedik ebben az időszakban, míg a Th1 sejteké nem változik jelentős mértékben.
4. Az anyatejjel táplált újszülöttek T sejtjeinek proliferációja a nem öröklött anyai antigénekre specifikus és regulátoros T sejt-függő csökkenést mutat az első három élethétben. Ehhez kapcsolódóan a gyulladásos citokinek termelése is csökken ezen sejtekben. Az újszülött anyatejben található anyai sejteknek való kitettsége tehát elősegíti a regulátoros T sejtek érését, és toleranciát alakít ki az újszülöttben a nem öröklött anyai antigének iránt.
5. A kizárólag anyatejjel táplált újszülöttek székletmintáiban a rövid szénláncú zsírsavakat termelő baktériumok (*Veillonella* és *Gemella*) dúsulása figyelhető meg a tápszerrel táplált újszülöttekhez képest. Hálózatos elemzésünk alapján a *Veillonella* nemzetség tagjainak jelenléte a regulátoros T sejtek számának növekedésével, míg a bőrflóra tagjainak jelenléte a T sejtek proliferációjával függ össze újszülöttkorban.

6.3. Foszfodiészteráz-gátlók hatása a T sejtek működésére

6. Míg felnőtt T sejtekben csupán a ZM241385 nevű specifikus A2A receptor antagonistá növelte 1,14-szeres mértékben a kalciumbeáramlást, addig újszülöttek T sejtjeiben a koffein, milrinon, sildenafil, ZM241385 és a dbcAMP, egy szintetikus cAMP analóg is a kalciumbeáramlás emelkedését váltotta ki. Újszülöttek T sejtjeiben a koffein jobban növeli a kalciumbeáramlást, mint a milrinon vagy a sildenafil. Ezt a hatást feltehetőleg elsősorban az emelkedett cAMP szint, mintsem az A2A receptoron keresztüli gátlás közvetíti.

7. A koffein, milrinon, sildenafil, ZM241385 vagy dbcAMP alkalmazása sem a felnőtt, sem a köldökzsinórvér eredetű T sejtek citokintermelését (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17) nem befolyásolja. Összességében a koffein, milrinon és sildenafil alkalmazása nem mutat immunszuppresszív hatást a köldökzsinórvér T sejteken.
8. A cAMP lebontásában szerepet játszó ektoenzim, a CD203c expressziója csökkent köldökzsinórvérből származó Th1 és CD8 sejteken felnőtt sejtekhez viszonyítva. Ez a csökkenés a cAMP által mediált kalciumbeáramlás fokozódását eredményezheti a T sejtek mikro környezetében kialakuló emelkedett cAMP szint kapcsán.
9. A T sejtek citokintermelésében kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor, a NFAT expressziója csökkent újszülöttek Th1 és CD8 sejtjeiben felnőtt sejtekhez hasonlóan, melynek szerepe lehet abban a megfigyelésben, hogy a köldökzsinórvért a T sejt válasz Th2 irányú eltolódása jellemzi.

6.4. Perinatális asphyxia és újszülöttkori stroke

10. A CD4+ IL-1 β + sejtek gyakorisága és extravazációja nagyobb mértékű súlyos, mint enyhe aszfixia esetében a 6. életórán. ROC analízisünk alapján a CD4+ IL-1 β + és a CD4+ IL-1 β + CD49d+ sejtek prevalenciájának vizsgálata a 6. életórán előre jelezheti az aszfixia súlyossági fokát már a korai stádiumban.
11. A plazma IL-6 szint magasabb volt súlyos, mint enyhe aszfixiában egy hetes korban, és szintje csökkenést mutatott egy hónapos korra az enyhe csoportban. Az IL-6 intracelluláris szintje mindkét csoportban 24 órás életkorra érte el csúcspontját. A CD4+ sejtek intracelluláris TNF- α szintje mindkét csoport esetén 6 órás életkorhoz képest emelkedett volt minden időpontban. Egy hónapos korra az intracelluláris TNF- α szint magasabb volt a súlyos csoportban. Az IL-1 β és az IL-6 feltehetően a gyulladásos válasz korai eseményeiben játszanak döntő szerepet, míg a TNF- α úgy tűnik, hogy az

elnyújtott neuroinflammáció kiváltásában és fenntartásában kulcsfontosságú, ami kedvezőtlenebb neurológiai kimenetellel járhat.

12. A kinurenin szint mindkét aszfixiás csoportban csökkenést mutat egy hetes életkorra, azonban egy hónapos életkorban magasabb az enyhe csoportban. Hasonló eredmény volt megfigyelhető a kinurénsav esetében is, a triptofán szintje azonban jelentősen emelkedett egy hónapos életkorra mindkét csoportban. Az IDO és a triptofán katabolizmus fokozott aktivációja közvetlenül a hypoxiás inzultust követően egy olyan szabályozó mechanizmus része lehet, mely a gyulladáshoz vezető reakció mértékét csökkenti.
13. 6 és 72 óras korban a CD8+ IL-10+ sejtek gyakorisága alacsonyabb volt stroke-ban, mint súlyos aszfixiában. 6 óras korban a CD8+ sejtek több IL-17-et termeltek stroke-ban, mint aszfixiában. 72 óras korban a CD8+ sejtek több IL-6-ot termeltek súlyos aszfixiában, mint stroke-ban, de e sejtek IL-6 termelése emelkedett maradt egy hónapos korig stroke-ban, míg aszfixiában csökkenést mutatott. Összességében a CD8+ sejteket nagyobb mértékű pro-inflammatorikus válasz jellemzi stroke-ban, mint aszfixiában.
14. Egy hónapos életkorra a CD4+ TGF- β + limfociták prevalenciája csökkent stroke-ban aszfixiához képest. Szintén egy hónapos korra az IL-4, IL-12 és IL-17 citokinek plazmaszintjei is csökkentek stroke-ban, aszfixiában azonban emelkedettek maradtak. Összességében tehát 72 óras korban a gyulladáshoz vezető válasz kifejezettebbnek tűnik stroke-ban, de hamarabb lecseng, mint aszfixiában.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA

7.1. Az értekezés témájához kapcsolódó nemzetközi közlemények

1. Grozdics E, Berta L, Gyarmati B, Veres G, Zádori D, Szalárdy L, Vécsei L, Tulassay T, **Toldi G.** B7 costimulation and intracellular indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in umbilical cord blood and adult peripheral blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:1659-65. IF: 3.404
2. Wood HL, Acharjee A, Pearce H, Quraishi MN, Powell RM, Rossiter AE, Beggs AD, Ewer AK, Moss P, **Toldi G.** Breastfeeding promotes early neonatal regulatory T cell expansion and immune tolerance of non-inherited maternal antigens. *Allergy.* 2020, in press. IF: 8.706
3. Orbán C, Vásárhelyi Z, Bajnok A, Sava F, **Toldi G.** Effects of caffeine and phosphodiesterase inhibitors on activation of neonatal T lymphocytes. *Immunobiology.* 2018;223:627-633. IF: 2.798
4. Bajnok A, Berta L, Orbán C, Veres G, Zádori D, Barta H, Méder Ü, Vécsei L, Tulassay T, Szabó M, **Toldi G.** Distinct cytokine patterns may regulate the severity of neonatal asphyxia – an observational study. *J Neuroinflammation.* 2017;14:244. IF: 5.193
5. Bajnok A, Berta L, Orbán C, Tulassay T, **Toldi G.** Cytokine production pattern of T lymphocytes in neonatal arterial ischemic stroke during the first month of life - a case study. *J Neuroinflammation.* 2018;15:191. IF: 5.700

7.2. Az értekezés témájához kapcsolódó magyar nyelvű közlemény

1. Pongor V, **Toldi G,** Szabó M, Vásárhelyi B. A terápiás célú teljesest-hypothermia szisztémás és immunmoduláns hatásai. *Orv Hetil.* 2011;152:575-580.

7.3. Tudománymetriai adatok

Összesített impakt faktor: 230.772

Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: 142.223

Összes hivatkozás: 1619

Független hivatkozás: 1271

Hirsch index: 19

Toldi Gergely tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2021.06.02)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	91	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	72	889	1021
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	2	5	6
szakcikk, magyar nyelvű	---	7	0	0
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	5	359	569
összefoglaló közlemény	---	2	5	6
rövid közlemény	---	3	12	15
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	4	---	---	---
idegen nyelvű	---	4	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	96	1270	1617
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	96	---	1270	1617
V. További tudományos művek	19	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	18	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Öltalmak, szabadalmak	---	1	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	2	---	1	2
Összes hivatkozás¹	---	---	1271	1619
Hirsch index⁶	19	---	---	---
g index⁶	39	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Szám	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	23	581
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	28	129
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2012) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	65	1016
Az utolsó 10 év (2011 - 2021) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	82	1436
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	276	17,05%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	94
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	1	7

Megjegyzések:

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Vásárhelyi Barna professzor úr irányítása alatt kezdtem el kutatással foglalkozni a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján. Köszönettel tartozom sokéves tanításáért és támogatásáért, mellyel TDK-, majd PhD-hallgatóként, valamint a PhD fokozat megszerzését követően is segített. Nem csupán a kritikus gondolkodás és a tudományos közlés alapjait sajátítottam el mellette, de arra is lehetőséget biztosított, hogy saját kutatási ötleteimet megvalósítsam. Szívből köszönöm útmutatását. Hálásan köszönöm **Tulassay Tivadar professzor úr** támogatását is, aki mindig biztatott arra, hogy a klinikusi-kutatói pályát kövessem, és az általa vezetett klinikán ehhez megteremtette a szükséges feltételeket. Köszönöm szépen **Rigó János professzor úrnak**, hogy lehetőséget biztosított a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján végzett klinikai munkám mellett a kutatási tevékenység végzésére is. Hálával tartozom mentoraimnak, **Seri István professzor úrnak** és **Dr. Alison Bedford Russellnek**, akik mindig készek voltak tanácsaikkal segíteni. Az elmúlt években a **Dr. Balog Attilával** és **Dr. Folyovich Andrással** folytatott kutatási együttműködések baráti kötelékké erősödtek. Hálás vagyok nekik mindazért, amit tanultam tőlük, nem csupán a kutatómunka, hanem a betegellátás terén is. A betegek kompromisszumot nem ismerő szakmai igényességgel végzett, együttérző szolgálatával saját klinikai tevékenységemhez is példát mutatnak.

Hálásan köszönöm a számtalan hazai és nemzetközi kollaborációs partnernem, különösen is a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, a Szegedi Tudományegyetem, valamint a University of Birmingham munkatársainak támogatását. Nagyra értékelem kutatási eredményeinkhez való hozzájárulásukat.

Kutatómunkám nem lett volna lehetséges hallgatóim tevékenysége nélkül. Szerencsésnek mondhatom magam amiatt, hogy tehetséges hallgatókkal dolgozhattam együtt, akik

érdeklődéssel vizsgálták a megválaszolandó immunológiai kérdéseket. Büszkeséggel tölt el, hogy PhD témavezetőként segíthettem **Dr. Bajnok Anna**, **Dr. Grozdics Enikő** és **Dr. Florentina Sava** munkáját.

Külön szeretném felidézni kiváló hallgatóm és barátom, **Dr. Orbán Csaba** emlékét, akinek élete és tudomány iránti elkötelezettsége mindannyiunk számára példával szolgál. Csaba nem csupán elhivatott kutató, hanem lelkes, melegszívű, segítőkész személyiség volt, kitűnő humorérzékkel megáldva. Betegségével való küzdelmének utolsó pillanatáig az volt a prioritása, hogy példátlan motivációval befejezze munkáját, mely a betegek javát szolgálja. Korai elvesztése négy éve hatalmas űrt hagyott azokban, akik ismerték és szerették őt. Hiánya azóta sem enyhült, és örökségét, a tudomány előmozdítása iránti elhivatottságot továbbra is őrizni fogjuk.

Végezetül örök hálával tartozom azoknak a családoknak és újszülötteknek, akik biológiai mintákkal járultak hozzá vizsgálatainkhoz. Önzetlenségük és másokon való segíteni akarásuk nélkül ezek az eredmények nem születhettek volna meg.