

Bíráói vélemény

Dr. Toldi Gergely:

“A T sejtes immunválasz újszülöttkori jellemzőinek vizsgálata”

című MTA doktori munkájáról

Dr. Toldi Gergely MTA doktori értekezésében az újszülöttkori immunrendszer karakterizálása céljából végzett, elsősorban T lymphocytá alcsoportok elemzésére irányuló vizsgálatait ismerteti. Ez a kutatási terület roppant érdekes és fontos, mivel tudásunk ezen életszakasz immunológiai jellemzőiről elmarad a felnőttkori immunműködésről szerzett ismereteinkhez viszonyítva, miközben a születés körüli történések jelentősen befolyásolják az immunrendszer fejlődését és későbbi működését. A folyamatok feltárása terápiás következményekkel és prevenciós lehetőségek megismerésével is kecsegtet. Vizsgálatainak értékét az is emeli, hogy humán mintákon dolgozott, melyekhez való hozzáférés erősen korlátozott, így az ilyen típusú közlések száma kevés. Az újszülöttkori vizsgálatok mellett beszámol egészséges és patológiás terheseken végzett vizsgálatairól is. Ennek fényében talán az értekezés címe lehetett volna kissé tágabban értelmezhető, pl. „A T sejtes immunválasz jellemzőinek vizsgálata újszülöttekben és terhesekben”.

Az értekezés angol nyelven íródott összesen 172 oldal terjedelemben, melynek felépítése a megszokott felépítést követi, egy rövid általános Bevezetés után az Irodalmi háttérrel mutatja be 18 oldalon át, majd a Célkitűzések következnek 3 oldalon keresztül, az Anyag és módszer 27 oldalon keresztül, és az Eredmények rész 39 oldalon át. A Megbeszélés és az Új tudományos eredmények összefoglalása szintén arányosan 30, illetve 5 oldalt foglalnak el. A 26 oldalas Irodalomjegyzék 253 irodalmi hivatkozást említ. A felépítés jól érthető, logikus, az írásmód gördülékeny, könnyen követhető. Formailag kiváló, rendezett. Elütést, betűhibát keveset tartalmaz a mű. Az MTA értekezés alapját 8 nemzetközi és 1 magyar nyelvű közlemény adja, melyek közül az angol közlemények esetében 2 közleményben elsőszerező, 6 közleményben utolsószerező a jelölt. A magyar nyelvű közleményben társszerző a jelölt. A közlő újságok összesített impakt faktora 33,775. Ezen közreművevényekre érkezett citációk száma 88. Ezeken túl a PhD megszerzése óta 54 nemzetközi közleményben volt szerző, melyek közül 27 esetében első- vagy utolsószerező. Ez azt mutatja, hogy igen tág tudományos területen mozog a jelölt, sok együttműködésben

vesz részt, ugyanakkor sok kutatást irányít önmaga is. Összesített impakt faktora 230,7. Összesített citációja 1619, Hirsch indexe 19.

Az értekezés egyes részeit tartalmilag bírálva megállapítható, hogy az irodalmi háttér összefoglalásául szolgáló 2. fejezetben azokat a tudományos eredményeket ismerteti, melyek a témában kevésbé jártas szakember számára megvilágítják ezt a tudományterületet, rámutat a szükséges összefüggésekre, megismerteti a fő kihívásokat és felveti a megválaszolendő kérdéseket. Ugyanakkor nagyon sajnáltam, hogy ezekről a jól szemléltethető területekről a 17 oldal során összesen csak 1 ábrát és 1 táblázatot mutat be. Jelentősen segítette volna a bíráló, illetve más olvasó számára a megértést egy-egy ábra a regulatórikus T sejtek alcsoportjairól, az aszfixia, a neuroregeneráció vagy a neonatális artériás ischémiás stroke patofiziológiájáról.

A következő részben logikusan célul tűzi ki a bevezetőben említett megválaszolatlan tudományos kérdéseket. A fő célokat pedig alcsoportokra bontva, további célokat sorol fel. Ezen célkitűzési pontok valójában megfelelnek egy-egy közleménynek és így 6 közlemény alapján épül fel a továbbiakban a Módszertani, az Eredmények és a Megbeszélés rész, valamint az Új tudományos eredmények összefoglalása is.

A Módszertani részben tehát egy-egy közleményre bontva ismerteti az egyes módszereket, amely a közleményeket ugyan jól érthetővé teszi, ugyanakkor ismétlésekhez vezet, hiszen többször kerül leírásra például az áramlási citometria és a vérsejtek szeparálása is. Alapvetően nagyon hasonló módszertant alkalmaz valamennyi közleményében, elsősorban áramlási citometria segítségével végzi sejtfelszíni és sejten belüli markerek detektálását, valamint intracelluláris citokinek mérését. Ezen kívül alkalmaz HPLC, ELISA, kevert lymphocytá sejt kultúra vizsgálatokat és DNS szekvenálási módszert. Ez a módszertan korrekt és megfelelő a kérdések megválaszolásához, néhány közleményben a molekuláris biológia legújabb módszertani lehetőségeit is alkalmazza, bár talán ezt a jövőben még többször is javasolt lesz használni. Az izgalmas munkákra kapott viszonylag alacsony idézettségi szám (8 közleményre 88 citáció), amin kicsit elgondolkodtam, esetleg összefüggésben lehet azzal, hogy manapság a legújabb módszerekkel végzett kutatások könnyebben a középpontba kerülhetnek, és még nagyobb érdeklődésre tarthatnak számot. Ez persze nem von le semmit a munka értékéből, de a „megismertetésében” sokat segíthet egy-egy különleges módszer vagy erre épülő demonstratív ábra.

Az Eredmények ismertetése logikus, az ábrák érthetőek, itt is leginkább a megszokott formákat alkalmazta a jelölt. A gondosan összeállított ábrák és táblázatok valóban segítik az olvasót a megértésben, egyedül a 14. és 15. ábra minősége kifogásolható kissé, nagyon nehezen olvashatóak, rossz a felbontásuk.

Ehhez a részhez megjegyezném, hogy nagyon hasonló típusú citokin csoportot vizsgált több munkájában is és nem teljesen volt számomra világos, hogy mi alapján választotta ki ezeket a citokineket. Az IFN- γ , az IL-4, és az IL-17 valóban jól tudják képviselni Th1, Th2 és Th17 sejteket, de az IL-4 helyett az IL-13 sokkal jobban alkalmazható a Th2 sejtek vizsgálatára, mivel nagyobb koncentrációban és hosszabb ideig mutatható ki. Ugyanakkor nem teljesen értem az IL-6 és IL-8 gyakori mérését, mivel ezek nem elsősorban T sejtekre jellemző citokinek. Második általános megjegyzésem az Eredmények részről több vizsgálatra vonatkozóan is, hogy mivel kísérletei során több összehasonlítási rendszert vizsgál egyszerre egy kísérletben is, az eredmények felsorolás szerű ismertetésénél sajnos nem mindig válik külön, hogy éppen melyik csoportot hasonlítja melyikkel össze. Ez a nehézség különösen az anyatejes táplálással és az aszfixiával kapcsolatos munkáknál szembeötlő. Az újszülöttkori aszfixia vizsgálata során például összehasonlítja a CD4, CD8 sejteket, a súlyos és enyhe betegeket, összehasonlít 5 időpontot és számos citokint mér, ami azt eredményezi, hogy az Eredmények részben nagyon nehéz követni, hogy éppen melyik összehasonlításról ír. A harmadik általános megjegyzésem az Eredmények részhez kontrollok kérdése. Az anyatejes táplálás immunológiai hatásának vizsgálata során, például amikor az anyai eredményeket a gyermek születéskori eredményeivel, majd a 3 hetes kori eredményeivel veti össze még egy plusz egészséges felnőtt kontroll is szerepel a 7. a és b., valamint a 10. ábrán. Ezt nem teljesen értem, hiszen ebben az összehasonlításban a gyermek eredményeit a felnőtthez hasonlítja, ott vagy az anyai vagy az egészséges kontroll elegendő lett volna, mert a cél a gyermek és a felnőtt összehasonlítása, miért kell az újszülöttet 2 felnőtt mintához is nézni, és mikor melyikhez hasonlítja? Az aszfixia vizsgálataiban pedig véleményem szerint hasznos lett volna egészséges újszülöttek kontrollként való alkalmazása is a közepes és a súlyos betegek összehasonlításakor a sejttípusok és a citokinek szintjét tekintve, hiszen nehezen értelmezhető egy egészséges kontroll alapérték nélkül a kapott eredmény.

A Megbeszélés rész érthető és követi a korábban alkalmazott felosztásokat. Az Új tudományos eredmények ismertetése rész véleményem szerint kissé sematikus és hosszú lett. Egy jobban tömörített, rövidített, iránymutatást és következtetést is tartalmazó pontokba szedett ismertetés talán hasznosabb lett volna, mint a sejtszintű eredmények rövidített, de ismétlésszerű felsorolása.

Az általános megjegyzéseken túli kérdéseim és észrevételeim a következők:

1. Az antigén prezentáló sejtekben a B7.1. és B7.2. molekulákon keresztüli visszaható jelátvitel mindig immunszuppresszív jellegű? Független-e ez az antigén prezentáló sejteknek a T sejtre gyakorolt kostimulációjának irányától, hiszen a CD28 B7.1 az aktiváló IL-2 termelést fokozó kapcsolat. Elképzelhető,

hogya a B7.1 a T sejten keresztül aktivációt, míg visszaható jelátvitel révén az antigén prezentáló sejtben immunszuppressziót vált ki?

2. Mivel mind a CD28+ T sejtek prevalenciája, mind a CD278+ és a CD279+ sejtek aránya magasabb volt egészséges várandósságban nem várandósokhoz képest, ugyanakkor a CD80+ és CD275+ monociták gyakorisága alacsonyabb volt egészséges várandósokban, nem gondolja, hogy ez ellentmondás? Mi lehet ennek a magyarázata, lehet, hogy nem ezek a típusú kostimulációs molekulák jellemzik igazából a terhességi immunitást, hiszen sok egyéb kostimulációs fehérje létezik?

3. Preeclampsia esetén jelentős gyulladás és immuntolerancia sérülés mutatható ki. Véleménye szerint melyik folyamat alakul ki először: a gyulladás vezet fokozott immunaktivitáshoz és a tolerancia csökkenéséhez vagy a tolerancia csökkenése vezet gyulladáshoz? A Treg szám csökkenés következménye vagy oka a preeclampsias gyulladásnak?

4. A kimerült Treg altípus apoptózison keresztül meghal vagy képes később újra effektor Treg funkcióra?

5. Az újszülöttkori bélfloóra születés utáni kialakulása roppant fontos az újszülött immunrendszerének fejlődése során. A bőr mikrobiom kialakulásának mennyire tisztázott hasonló szerepe az immunrendszer fejlődésében? Milyen adatokat ismer erre nézve?

6. A hypoxiával összefüggő neuroinflammáció esetében az időfaktort illetően milyen a hatása a rövid- és milyen a hatása a hosszútávon fennálló hypoxiának?

7. Vizsgálták a születéskori immunsejteken a B7 kostimuláló molekulák jelenlétét, valamint az IDO expressziót, és ezt összehasonlították felnőtt adatokkal. Azt kérdezném, hogy a gyermekkor különböző stádiumában, illetve serdülőkorban ismer-e adatokat az immunrendszer fenti jellemzőinek, esetleg egyéb jellemzőinek fejlődésére nézve? Ugyancsak kérdezném, hogy ismer-e adatokat a Treg szintek alakulásáról időrendben a gyermek felnőtté válása során?

8. A tézisekben a 6. oldalon a CTLA-4 úgy szerepel, mint CD154, azonban máshol végig helyesen CD152-t ír.

9. Azt állapítja meg, hogy az újszülöttekben, akik anyatejes táplálásban részesültek, anyai antigénekre specifikus tolerancia jelent meg. Ez egy nehezen értelmezhető immunológiai jellemző, hiszen a szoptatás hatása csak a születés után alakulhat ki az immunrendszerre. A születés után azonban már nem találkozunk a magzati immunrendszer anyai sejtekkel jelentős mértékben, esetlegesen az anyatejben lehetnek jelen. Ugyanakkor biológiai értelmét sem látom, hiszen ha az anyatej fogyasztás fokozza az

immunrendszer tolerancia képességét, akkor annak több antigénnel szemben is érvényesülnie kellene, nemcsak az anyai antigénnel szemben. Kérdezném, hogy véleménye szerint ennek mi a biológiai értelme, hiszen ha a szoptatás toleranciát indukálna, akkor más antigénnel szemben is elvárnánk ezt, izoláltan anyai antigénnel szemben nehéz megérteni ennek a biológiai értelmét?

Új megállapításként fogadom el:

1. Újszülöttekben a B7.2 – CTLA-4 gátló kostimuláció nagyobb mértékben érvényesül, mint felnőttek esetén. A köldökzsinórvérben a plazmaIDO aktivitása kétszer magasabb, mint felnőttekben, azonban ez nem magzati eredetű.

2. A CD80+ és CD86+ aktivált monociták gyakorisága, azIDO-t expresszáló T sejtek és monociták aránya és azIDO MFI értéke T sejtekben alacsonyabb preeclampszában mint egészséges terhesekben.

3. A Tregok csökkenése preeclampszában specifikus bizonyos Treg sejt altípusokra. A funkcionálisan legaktívabb effektor Treg sejt prevalenciája csökken leginkább, míg a naiv Treg sejt esetében nincs változás. A „kimerült” Tregok magasabb gyakorisága mutatja a Treg sejt funkcionalitásának csökkenését preeclampszában.

4. A regulátoros T sejtek és a Th17 sejtek mennyisége emelkedik az első három élethétben. A kizárólag anyatejjel táplált újszülöttekben a Treg szám emelkedése magasabb.

5. A kizárólag anyatejjel táplált újszülöttek székletmintáiban a rövid szénláncú zsírsavakat termelő baktériumok (Veillonella és Gemella) dúsulása figyelhető meg a tápszerrel táplált újszülöttekhez képest. A Veillonella nemzetség tagjainak jelenléte a regulátoros T sejtek számának növekedésével, míg a bőrflóra tagjainak jelenléte a T sejtek proliferációjával függ össze újszülöttkorban.

6. Köldökzsinórvérből származó Th1 és CD8 sejteken felnőtt sejtekhez viszonyítva a cAMP lebontásában szerepet játszó ektoenzim, a CD203c expressziója csökkent. Ez a csökkenés a cAMP által mediált kalciumbeáramlás fokozódását eredményezheti és összefügghet azzal, hogy, míg felnőtt T sejtekben csupán a ZM241385 nevű specifikus A2A receptor antagonistája növelte a kalciumbeáramlást, addig újszülöttek T sejtjeiben a koffein, milrinon, sildenafil, ZM241385 és a dbcAMP, egy szintetikus cAMP analóg is a kalciumbeáramlás emelkedését váltotta ki.

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, IL17) nem befolyásolja.

8. A T sejtek citokintermelésében kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor, a NFAT expressziója csökkent újszülöttek Th1 és CD8 sejtjeiben felnőtt sejtekhez hasonlítva, melynek szerepe lehet abban a megfigyelésben, hogy a köldökzsinórvért a T sejtvesztés Th2 irányú eltolódása jellemzi.

9. A CD4+ IL-1 β + sejtek gyakorisága és extravazációja nagyobb mértékű súlyos, mint enyhe aszfixia esetében a 6. életóránál. A CD4+ IL-1 β + és a CD4+ IL-1 β + CD49d+ sejtek prevalenciájának vizsgálata a 6. életóránál előre jelezheti az aszfixia súlyossági fokát már a korai stádiumban.

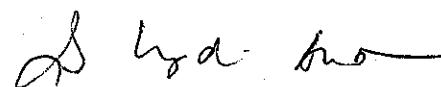
10. Egy hetes korban a plazma IL-6 szint magasabb súlyos aszfixiában, mint enyhe formában és szintje csökkenést mutatott egy hónapos korra az enyhe csoportban. Az intracelluláris TNF- α szint magasabb súlyos aszfixiában egy hónapos korban. Az intracelluláris IL-6 szintje mindkét csoportban 24 óras életkorra érte el csúcspontját, míg a CD4+ sejtek intracelluláris TNF- α szintje mindkét csoport esetén 6 óras életkorban a legalacsonyabb, később emelkedik. 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.

11. A kinurenin szint mindkét aszfixiás csoportban csökkenést mutat egy hetes életkorra, azonban egy hónapos életkorban magasabb az enyhe csoportban. Hasonló eredmény volt megfigyelhető a kinuréninsav esetében is, a triptofán szintje azonban jelentősen emelkedett egy hónapos életkorra mindkét csoportban.

12. A CD8+ sejteket nagyobb mértékű pro-inflammatorikus válasz jellemzi stroke-ban, mint aszfixiában. Egy hónapos korra az IL-4, IL-12 és IL-17 citokinek plazmaszintjei is csökkentek stroke-ban, aszfixiában azonban emelkedettek maradtak, ami arra utalhat, hogy a kifejezettebb gyulladásos válasz hamarabb lecseng stroke-ban, mint aszfixiában.

Mindent egybevetve, nem kétséges, hogy a hiteles adatokra épülő dolgozat, illetve a közlemények száma és színvonala megfelel az MTA doktora cím elnyeréséhez szükséges követelményeknek. Egyértelmű, hogy a PhD fokozat megszerzése óta eltelt időben Dr. Toldi Gergely eredeti tudományos eredményekkel gyarapította az újszülöttek és terhesek immunrendszerével kapcsolatos ismereteket. Mindezek alapján javaslom a disszertáció nyilvános vitájának kitűzését, továbbá a mű elfogadását.

Debrecen, 2024. 02.08.



Prof. Dr. Szegedi Andrea
egyetemi tanár, tanszékvezető