

**Bírálat Toldi Gergely „Characteristics of the T cell response in the neonate” című MTA  
doktori értekezéséről**

A közelmúltig az újszülött immunrendszerét éretlennek tartották a felnőttekéhez képest, de az utóbbi évek kutatásai alapján, amihez a Jelölt is jelentős mértékben hozzájárult, kiderült, hogy nem annyira éretlenségről van szó, hanem sokkal inkább arról, hogy szabályozása eltér a felnőttekétől. Az eltérő szabályozást indokolja, hogy az intrauterin életben szükség van az immuntoleranciára a nem öröklött anyai antigénekkal szemben és erre még az extrauterin élet kezdetén is szükség van az anyatejes táplálás során. A tolerogén szabályozás miatt azonban a kórokozókkal szembeni immunvédelem jelentős mértékben csökkent ebben az életkorban, ami hajlamosít, különösen koraszülöttekben a fertőzések kialakulására. Ezért nagyon fontos ismerni az újszülöttekre jellemző immunmechanizmusokat, amelyek pontosabb ismeretében lehetőség nyílik számos újszülöttkori kórkép megelőzésére és hatékonyabb kezelésére.

Toldi Gergely kutatásait öt fő irányban végezte, amelyek mindegyike jelentősen hozzájárul az újszülöttkori immunmechanizmusok pontosan megértéséhez. Először azt elemezte, hogy az antigén prezentációban fontos szerepet játszó kostimulációs mechanizmusok, amelyek jelentősen befolyásolják a T sejtek aktiválását, mennyire különböznek egészséges, érett újszülöttekben a felnőttekhez képest, valamint, hogy milyen eltérések figyelhetők meg egészséges várandósság és preeclampsia esetén. Második kutatásában vizsgálta, hogy a T-regulátor sejtek alcsoportainak megoszlásában milyen különbségek észlelhetők egészséges várandósság és preeclampsia között. Ugyancsak meghatározta az immunregulációban fontos szerepet játszó indoleamin 2, 3-dioxigenáz enzim expresszióját ezekben a vizsgálatokban, valamint a triptofán, kinurenin és kinurénsav termelést. Harmadik kutatása annak a megfigyelésére irányult, hogy anyatejes táplálás és az intestinális mikrobióta összetétele, miként befolyásolja az újszülött immunitását, különös tekintettel a regulátor T-sejtek csoportjaira. Kutatásainak negyedik részében azt kutatta, hogy a neonatológiában gyakran használt foszfodieszteráz gátló gyógyszereknek milyen immunológiai hatásai vannak. Munkáinak ötödik része végül arra irányult, hogy két gyakori, főként az érett újszülöttekben előforduló kórképben a hipoxémiás iszkémiás aszfixiában és a neonatális artériás iszkémiás stroke-ban a gyulladáisos immun reakciók hogyan befolyásolják a progressziót.

Az értekezés terjedelme 158 oldal irodalmi hivatkozásokkal együtt. A dolgozat 11 táblázatot és 25 ábrát tartalmaz. Az irodalmi hivatkozások száma 253, de megemlíteném azonban hogy 2020. év utáni közlés nem található közöttük. Az értekezéssel kapcsolatos publikációk impakt faktora

88, a Jelölt összes impakt faktora pedig 230,772, amelyek egyértelműen megfelelnek az MTA Doktori Tanácsa elvárásának.

Az értekezés elején található egy részletes **rövidítés jegyzék**, majd ezt követi egy rövid **bevezetés**, amiben a Jelölt megemlíti, hogy neonatológiai gyakorlatában nagyon gyakran találkozott súlyos neonatológiai infekciókkal, ami felvetette, hogy ebben az újszülöttek sajátos immunregulációs mechanizmusai is fontos szerepet játszanak, amelyeknek a megértése segíthetne a jobb kezelésben. Ez a felismerés nagymértékben motiválta kutatásait.

A **Háttér** című fejezet logikusan mutatja be a kutatási témák irodalmát és a felmerülő újabb kérdéseket. A **Célkitűzések** fejezetben leírt kérdések, amelyekre a Jelölt választ keresett kutatásaiban már logikusan következnek a Háttér című fejezetből.

Az igen alaposan és igényesen összeállított **Módszerek** fejezet témák szerint csoportosítva ismerteti a vizsgált betegek és kontroll csoportok paramétereit, valamint az alkalmazott vizsgálati eljárásokat. Hangsúlyozandó, hogy minden vizsgálat etikai engedélyezése megtörtént.

A módszerek között központi szerepe van az áramlási citometriának, amivel lehetséges a lymphocyták elkülönítése felszíni és citoplazmatikus markerek alapján. Jelölt kinetikai mérésekre is használta az áramlási citometriát, így mérte a kalcium beáramlást a sejtekbe és a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződését azokban. A mérésekhez saját fejlesztésű FacsKin szoftvert használtak.

Az anyatejes táplálás hatását a neonatalis immunválaszra vegyes lymphocyta reakciókban vizsgálták (MLR). Az izolált újszülött T sejteket irradiált anyai mononukleáris sejtekkel stimulálták öt napon át, majd elvégezték a MLR-t izolált anyai lymphocyták és újszülöttek izolált és irradiált mononukleáris sejtjei között is. Ezt követően áramlási citometria segítségével detektálták a sejtproliferáció mértékét az egyes lymphocyta alcsoportokban.

Megjegyezném azonban, hogy az áramlási citometriával kapcsolatos rövidítések jelentős része nem szerepel a rövidítésjegyzékben, aminek feloldása gyakran igényelt alapos google keresést.

Az alkalmazott igen nagyszámú konjugált antitesteket jobb lett volna táblázatban feltüntetni.

Igényes módszerekkel történt a három hetes újszülöttekben a széklet DNS kivonása és abból a 16S rRNS-t kódoló gének amplifikálása. A statisztikai analízis során a random forest gépi tanulási módszer használtak. Ugyancsak figyelemre méltó az eredmények hálózati analízise,

ami lehetővé tette a korreláció analízist az egyes immun paraméterek és az különböző mikrobióta genusok között, amelyeket vizuálisan jól áttekinthető ábrán szemléltettek (**15. ábra**).

A perinatalis aszfixia és a az újszülöttkori stroke során a betegek beválasztása megfelelően történt, az alkalmazott módszerek alkalmasak voltak annak megválaszolására, hogy kimutathatók-e olyan immunológiai markerek, amelyekből következtetni lehet a kórképek prognózisára.

Az **Eredmények** fejezet 38 oldal terjedelmű, amiben a Jelölt az egyes témákban elért eredményeit részletesen ismerteti, didaktikusan és jól érthetően. Jónak tartom, hogy az összes adat bemutatásakor azokat táblázatban foglalja össze, de a különösen lényeges eredményeket ábrákon mutatja be. Kiemelést érdemel a 23 ábra, amelyik ROC analízissel mutatta be, hogy a CD4+ IL-1beta és a CD4+IL-1beta CD49d+ sejtek emelkedett száma az aszfixiás újszülöttek 6 órában rosszabb prognózisra utal.

A **Megbeszélés** fejezet az egyes témák szerint csoportosítva értékeli az eredményeket, ütköztetve az irodalomban közölt korábbi eredményekkel. A következtetések levonása mértéktartó, amit indokol az is, hogy a vizsgálatokat sokszor csak kisebb betegcsoportokban sikerült elvégezni.

#### **Kérdéseim az értekezéshez:**

1. Az intestinalis mikrobióta milyen mértékben képesIDO-t termelni és így hozzájárulni a Treg sejtek nagyobb számú kialakulásához?
2. Mi magyarázhatja azt, hogy preeclampsziás anyák átlagosIDO fluoreszcens intenzitása csökken? Feltételezhető-e összefüggés az anyai intestinalis flóra összetétele és a preeclampsia gyakorisága között?
3. Van-e állatkísérletes adat arra vonatkozóan, hogy csíramentes újszülött állatok reakciója erősebb-e a nem öröklött anyai antigénekre?
4. Van-e irodalmi adat arra, hogy 3 hetes kor után hogyan változik a perifériás vér lymphocytáiban a kostimulációs márkerek expressziója, mikorra érheti el a felnőtt értékeket?
5. Mi a magyarázata annak, hogy az értekezés 5. ábráján bemutatott pozitív korreláció ( $r = 0,36$ ) a CD11b+ CD86 sejtek /CD11b+ monocyták és a CD11b+IDO+ sejtek/CD11b+monocyták között egészséges és preeclampsziás várandósokban pontosan ellentéte annak, ami a köldökzsinór vérben megfigyelhető a köldökzsinór vérben ( $r = -0,59$ ).

6. Vizsgálati eredményei miként befolyásolják abban, hogy mikor melyik foszfodieszteráz inhibitor alkalmazná a neonatológiai terápiában? Alkalmazható-e egyes esetekben a teofillin is?
7. Történt-e már terápia neonatalis aszfixiában IL-1 receptor antagonistával a disszertáció megírása után eltelt időben.

**Megállapítom, hogy a Jelölt értekezése hiteles eredményeket tartalmaz. Mindegyik tézisének ténymegállapítását elfogadom az alábbiak szerint:**

1. A köldökzsínor CD4+ Tsejtek CTLA-4 expressziója fokozott és a CTLA-4-nek megfelelő kostimuláló molekulák, a B7-2 szintén emelkedett.
2. A plazma indoleamin 2,3-dioxigenáz (IDO) aktivitása köldökzsínórvérben kétszer magasabb, mint felnőtteké és a monocitákra visszaható, B7-2-n keresztüli jelátvitel éretlen.
3. A CD28+ T sejtek prevalenciája magasabb egészséges várandósságban nem várandósokhoz képest. Ezzel egyidőben a CD152 marker expressziója csökkent. Mind a CD278+, mind a CD279+ sejtek aránya magasabb volt egészséges várandósságban nem várandósokhoz képest. A CD80+ és CD275+ monociták gyakorisága alacsonyabb volt egészséges várandósokban. A CD80+ és CD86+ aktivált monociták gyakorisága alacsonyabb preeclampsziában, mint egészséges várandósságban.
4. Az IDO-t expresszáló Tsejtek és monociták aránya magasabb egészséges várandósságban, mint preeclampsziában, vagy nem várandósok körében. Az IDO MFI értéke a T sejtekben szintén magasabb egészséges várandósságban, mint preeclampsziában, vagy nem várandósok körében.
5. A funkcionálisan legaktívabb effector Treg sejtek prevalenciája csökken leginkább preeclampsziában, a naív Treg sejtek száma nem változik.
6. A regulátoros T sejtek mennyisége emelkedik az első három élethétben, és számuk majdnem kétszeres a kizárólag anyatejjel táplált újszülöttekben, mind a kizárólag tápszeresekben.
7. Az anyatejjel táplált újszülöttek T sejtjeinek proliferációja a nem öröklött anyai antigénekre specifikus és regulátor T sejt-függő csökkenést mutat az első három élethétben
8. A kizárólag anyatejjel táplált újszülöttek székletmintáiban a rövid szénláncú zsírsavakat termelő baktériumok (Veillonella és Gemella) dúsulása figyelhető meg a tápszerrel tápláltakhoz képest. A Veillonella nemzetség tagjainak jelenléte a regulátor T sejtek

számának növekedésével, míg a bőrflóra tagjainak jelenléte a T sejtek proliferációjával függ össze újszülöttkorban.

9. Míg a felnőtt T sejtekben csupán a ZM241385 specifikus A2A receptor antagonistája növelte a kalciumbeáramlást, addig újszülöttek T sejtjeiben a koffein, a milrinon, a sildenafil, a ZM241385 és a dbc AMP is a kalciumbeáramlás emelkedését váltotta ki. Újszülöttek T sejtjeiben a koffein jobban növeli ezt, mint a milrinon, vagy a sildenafil.
10. A koffein, milrinon, sildenafil, ZM241385 vagy dbcAMP nem befolyásolta sem a felnőtt, sem a köldökzsinórvér eredetű T sejtek citokintermelését. A koffein, milrinon és sildenafil nem mutat immunosuppresszív hatást a köldökzsinór T sejtekben.
11. A cAMP lebontásában szerepet játszó CD203c ektoenzim expressziója csökkent a köldökzsinórvérből származó Th1 és CD8 sejteken felnőtt sejtekhez viszonyítva.
12. A T sejtek citokin termelésében kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor, a NFAT expressziója csökkent újszülöttek Th1 és CD8 sejtjeiben felnőtt sejtekhez viszonyítva, ami magyarázza, hogy a köldökzsinórvérben Th2 irányú eltolódás figyelhető meg.
13. A CD4<sup>+</sup> IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> sejtek gyakorisága és extravazációja nagyobb mértékű súlyos, mint enyhe aszfixia esetében a 6. életóránál. ROC analízis alapján a CD4<sup>+</sup> IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> és a CD4<sup>+</sup> IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> CD49d<sup>+</sup> sejtek prevalenciájának vizsgálata a 6. életóránál előre jelezheti az aszfixia súlyossági fokát.
14. A plazma IL-6 szintje 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<sup>+</sup> sejtek intracelluláris TNF- $\alpha$  szintje mindkét csoport esetén 6 órás életkorhoz képest emelkedett volt minden időpontban. Egy hónapos korra az intracelluláris TNF- $\alpha$  szintje magasabb volt a súlyos csoportban.
15. A kinurenin szintje 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. AzIDO és a triptofán katabolizmus fokozott aktivációja közvetlenül a hypoxiás inzultust követően egy olyan szabályozó mechanizmus része lehet, mely a gyulladási reakció mértékét csökkenti.
16. 6 és 72 órás korban a CD8<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> sejtek gyakorisága alacsonyabb volt stroke-ban, mint súlyos aszfixiában. 6 órás korban a CD8<sup>+</sup> sejtek több IL-17-et termeltek strokeban, mint aszfixiában. 72 órás korban a CD8<sup>+</sup> 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.

17. Egy hónapos életkorra a CD4+ TGF- $\beta$ + 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 órás korban a gyulladásos válasz kifejezettebbnek tűnik strokeban, de hamarabb lecseng, mint aszfixiában.

Végül kijelentem, hogy Toldi Gergely doktori művét nyilvános vitára minden szempontból alkalmasnak tartom

Budapest, 2024. január 14.

dr. Arató András

MTA doktora