

**AZ EMBRIÓ BEÁGYAZÓDÁS MECHANIZMUSÁNAK
VIZSGÁLATA: A PIBF SZEREPE, A KOMPETENS
EMBRIÓ AZONOSÍTÁSA**

Doktori (PhD) – értekezés

Csabai- Tanics Tímea Judith

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Reglódi Dóra

Programvezető: Dr. Mikó Éva

Témavezető: **Dr. Szekeres- Barthó Júlia**

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Biológiai Intézet



Pécs
2024

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés.....	10
1.1. Az implantációban szerepet játszó molekulák.....	10
1.2. Az anya és magzat immunológiai kapcsolata	12
1.2.1. A PIBF szerepe a beágyazódásban	12
1.2.2. A B- sejtek szerepe a terhességben.....	15
1.2.3. A T-sejtek szerepe a terhességben.....	16
1.2.4. Az NK- sejtek szerepe a terhességben	17
1.3. Extracelluláris vezikulák.....	18
1.3.1. Az extracelluláris vezikulák képződése	19
1.3.2. Az extracelluláris vezikulák kimutatása	20
1.3.3. Az extracelluláris vezikulák funkciója.....	20
1.3.4. Az extracelluláris vezikulák szerepe a terhességben.....	20
2. Célkitűzések	22
3. Anyagok és módszerek.....	23
3.1. Az implantációban szerepet játszó molekulák expressziójának vizsgálata in vitro tenyésztett egér embriókban	23
3.2. PIBF implantációban betöltött szerepének vizsgálata egérmodellben.....	24
3.2.1. PIBF biológiai hatásának semlegesítése a peri-implantációs időszakban egérmodellben.....	24
3.2.2. Immunhisztokémia.....	24
3.2.3. Deciduális B- sejtek vizsgálata immunfluoreszcenciával.....	25
3.2.4. Deciduális és perifériás limfociták citotoxicitásának mérése.....	26

3.2.5. <i>T- sejt aktivációban és Th1/Th2 differenciálódásban szerepet játszó markerek vizsgálata perifériás limfocitákon</i>	28
3.3. Nukleinsav tartalmú extracelluláris vezikulák számának meghatározása 5. napos tenyésztett humán embriók tápfolyadékában.....	29
3.3.1. <i>Áramlási citometria</i>	29
3.3.2. <i>Elektronmikroszkópos feldolgozás, immun elektronmikroszkópia</i>	30
3.4. PIBF + EV-k hatása a CD8+ T- sejtek citokintermelésére.....	31
3.4.1. <i>Egér embriók in vitro tenyésztése</i>	31
3.4.2. <i>EV-k azonosítása annexin V- el</i>	32
3.4.3. <i>EV-k kötődésének vizsgálata egér perifériás limfocitáihoz</i>	32
3.4.4. <i>EV-k limfocitákhoz kötődésének megakadályozása</i>	33
3.4.5. <i>Limfociták IL-10 termelésének vizsgálata</i>	33
3.5. Etikai engedély	34
4. Eredmények	35
4.1. Az implantáció során szerepet játszó markerek megjelenése a tenyésztett egér embriókban	35
4.2. A PIBF implantációban betöltött szerepének vizsgálata egérmodellben.....	37
4.2.1. <i>A peri- implantációs időszakban történő anti- PIBF kezelés csökkenti a beágyazódott embriók számát és növeli a rezorpciós arányt</i>	37
4.2.2. <i>Az anti- PIBF kezelés hatására csökken a PIBF pozitív deciduális NK sejtek száma</i>	38
4.2.3. <i>A deciduális és perifériás NK sejtek citotoxicitása anti-PIBF kezelt és kontroll egerekben</i>	39
4.2.4. <i>Deciduális B- sejtek az anti-PIBF kezelés hatására depletálódtak</i>	40

4.2.5. <i>A peri-implantációs időszakban PIBF hiányos egerek CD4+ T- sejtjein az aktivációhoz szükséges gének csökkent mértékben expresszálódnak és a T- sejtek Th1 irányba differenciálódnak</i>	41
4.3. PIBF+ EV-k hatása perifériás limfociták citokintermelésére.....	43
4.3.1. <i>Embrió eredetű EV-k kimutatása annexin V- el</i>	43
4.3.2. <i>Az embrió eredetű EV-k PIBF-t tartalmaznak</i>	45
4.3.3. <i>Az embrió eredetű EV-k foszfatidil- szerinen keresztül kötődnek a perifériás limfocitákhoz</i>	46
4.3.4 <i>Az embrió eredetű EV-k jelenlétében a CD8+ limfociták IL-10 termelése emelkedett</i>	50
4.4. A tenyésztett embriók által termelt nukleinsav tartalmú EV-k száma jelzi az embrió implantációs képességét.....	51
4.4.1. <i>A PI+ EV-k száma szignifikánsan alacsonyabb a kompetens embriók tápfolyadékában, mint azokéban, amelyek nem ágyazódnak be</i>	51
4.4.2. <i>A kompetens embrió azonosítása az 5. napos tenyésztőfolyadék PI+ EV tartalma alapján</i>	52
4.4.3. <i>A jó beágyazódási hajlammal rendelkező és a nem implantálódó embriók azonosítása</i>	55
5. Diszkusszió	57
6. Összefoglalás és következtetések	64
7. Köszönetnyilvánítás	66
8. Irodalomjegyzék	67
9. Tudományos Közlemények	85
10. Támogatások	91

11. Mellékletek	92
------------------------------	-----------

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrométer
ADAM7	Dizintegrin és metalloproteináz domént tartalmazó fehérje 7 (disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7)
APC	Antigén prezentáló sejt (antigen presenting cell)
BSA	Borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
CD	Differenciáció szerinti osztályozás (cluster of differentiation)
CEP	Centroszómális fehérjék (centrosomal proteins)
CO ₂	Szén-dioxid
DAB	Diaminobenzidin
DBA	Dolichos biflorus agglutinin
dNK sejt	Deciduális NK sejt
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
EV	Extracelluláris vezikula
FCγRIII	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III
FCS	Foetális borjúsavó (foetal calf serum)
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
FSC	Forward scatter
FSH	Follikulus stimuláló hormon
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony–Stimulating Factor

GP-83	Glycoprotein- 83
hCG	Humán koriogonadotropin
HLA-G	Humán leukocita antigén- G (human leukocyte antigen- G)
HRP	Tormagyökér peroxidáz (Horseradish Peroxidase)
IFN- γ	Interferon gamma
IGF2	Inzulin-szerű növekedési faktor 2 (Insulin-like growth factor 2)
IgG	Immunoglobulin G
IL-10	Interleukin 10
IL-12A	Interleukin 12 A
IL-2	Interleukin- 2
IL-2R	Interleukin 2 receptor
IL-3	Interleukin 3
IL-4	Interleukin- 4
IL-6	Interleukin- 6
ill.	Illetve
IVF	In- vitro fertilizáció
JAK1	Janus kináz 1
kDa	Kilodalton
KSOM	Kálium szimplex optimalizált médium (Potassium simplex optimized medium)
LIF	Leukémia gátló faktor (leukemia inhibitory factor)
MFI	Átlagos fluoreszcencia intenzitás (Mean fluorescence intensity)
mg	Milligramm
MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
MIF	Makrofág migrációt gátló faktor (macrophage migration inhibitory factor)

ml	Milliliter
mRNS	Messenger RNS
mtsai.	Munkatársai
NE	Nemzetközi egység
NK sejt	Természetes ölósejt (natural killer cell)
nm	Nanométer
NTA	Nanoparticle tracking analysis
P+S	Penicillin+ Sztreptomycin
P34H	34-kDa human epididymal sperm protein
PAI-1	Plazminogén aktivátor inhibitor- 1 (plasminogen activator inhibitor-1)
PBS	Foszfát pufferelt sóoldat (phosphate -buffered saline)
PCR	Polimeráz lánreakció (polimerase chain reaction)
PE	Fikoeritrin (Phycoerythrin)
PFA	Paraformaldehid
PI	Propidium- jodid
PIBF	Progeszteron indukálta blokkoló faktor (Progesterone Induced Blocking Factor)
PLGF	Placenta eredetű növekedési faktor (placental growth factor)
PR	Progeszteron receptor
PR- A	Progeszteron receptor A
PR- B	Progeszteron receptor B
PS	Foszfatidil szerin (phosphatidil serine)
PSR	Foszfatidil szerin receptor (phosphatidil serine receptor)
RNS	Ribonukleinsav
rpm	Fordulatszám (revolution per minute)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SE	Standard hiba (standard error)
SSC	Side scatter
STAT3	Transzkripció jelátvivője és aktiválója 3 (signal transducers and activators of transcription 3)
STAT6	Transzkripció jelátvivője és aktiválója 6 (signal transducers and activators of transcription 6)
TBS	Tris- pufferelt sóoldat (tris -buffered saline)
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF α	Tumor nekrosis faktor- alfa (tumor necrosis factor alpha)
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
vs.	Versus

1. BEVEZETÉS

A fejlett országokban egyre gyakoribb a meddőség előfordulása, ami részben azzal magyarázható, hogy az első terhesség vállalása későbbi életkorra tolódik, a magasabb anyai életkor pedig nem csupán az endometrium állapotát, de az embriók minőségét is negatívan befolyásolja [Hui és mtsai. 2022].

A terhesség létrejöttének első lépése a blasztociszta beágyazódása a fogadóképes endometriumba. A folyamat kezdetén, az embrió hozzátapad az endometriális epitheliumhoz, majd implantálódik és a trofoblaszt benyomul a decidualizálódott endometrium szövetébe. Az implantáció minden lépésében kulcsfontosságú szerepet játszik a progeszteron, melynek genomikus hatásait a klasszikus progeszteron receptor két formája, a progeszteron receptor A (PR-A) és B (PR-B) közvetítik. Ezek biológiai szerepének tisztázásában az infertilis PR knock out egerek [Fernandez-Valdivia és mtsai. 2005] nyújtottak segítséget. A PR-A elengedhetetlen az endometrium deciduális átalakulásához, és az endometriális receptivitás kialakulásához, a PR-B pedig az emlő mirigyállományának fejlődéséhez szükséges.

A beágyazódási zavarok egyrészt az endometrium nem megfelelő fejlődése, másrészt az embrió elégtelen implantációs képessége miatt alakulnak ki. Ezért kutatásaink gyújtópontjában az embrió beágyazódást befolyásoló immunológiai mechanizmusok vizsgálata, és a jó implantációs készséggel rendelkező embrió azonosítása állt.

1.1. Az implantációban szerepet játszó molekulák

Az implantáció során számos molekula játszik kritikus szerepet. A Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) elősegíti az angiogenezist az implantáció helyén. Az új erek képződése, létfontosságú a beágyazódó embrió táplálása és oxigénellátása

szempontjából [Guo és mtsai. 2021]. Az Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2) az embrionális növekedést és fejlődést támogatja. Az IGF2 elősegíti a sejtek proliferációját és differenciálódását [Bergman és mtsai. 2013].

A Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) immunmodulátorként működik, amely segíti a terhesség korai szakaszában a méhnyálkahártya befogadó képességének javítását. Befolyásolja az immunrendszer működését és hozzájárul a gyulladásos válaszok szabályozásához [Arcuri és mtsai. 2001]. A Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI1) szabályozza a fibrinolitikus rendszert, amely a sejtmatrix átalakulásában és a trofoblaszt invázióban játszik szerepet. Fontos a sejtek közötti matrix lebontásában és újjáépítésében, ami nélkülözhetetlen az embrió beágyazódásához [Ye és mtsai. 2017].

A Leukemia Inhibitory Factor (LIF) hozzájárul az endometrium sejteinek átalakulásához és előkészíti a méhnyálkahártyát az embrió fogadására [Stewart és mtsai. 1992], így elengedhetetlen a blasztociszta beágyazódásához. A Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) immunológiai szempontból kedvező környezetet teremt az implantációhoz azáltal, hogy gátolja az NK- sejtek aktivitását, és Th2 irányban tolja el az immunválaszt [Szekeres-Bartho és mtsai. 2001].

A Placental Growth Factor (PLGF) a placentáció során serkenti az angiogenezist és a trofoblaszt sejtek növekedését [Demir és mtsai. 2007]. A Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) szabályozza az immunválaszt és részt vesz az endometriális sejtek apoptózisában, ami befolyásolja az implantációs környezetet [Lédée-Bataille és mtsai. 2004].

1.2. Az anya és magzat immunológiai kapcsolata

1.2.1. A PIBF

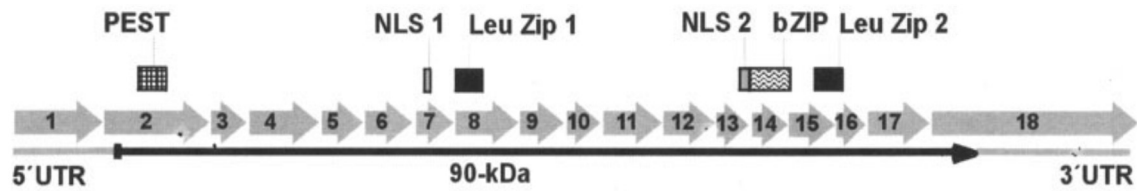
Az anya immunrendszere a normális terhesség során felismeri, de nem támadja meg a magzaton kifejeződött apai eredetű antigéneket, hanem tolerálja azokat. Ebben a folyamatban kulcsfontosságú szerepet tölt be a progeszteron, valamint egy különleges fehérje, a PIBF. A PIBF a progeszteron immunmodulációs hatásait közvetíti és hozzájárul egy olyan immunológiai környezet kialakításához, amely elősegíti a magzat megfelelő fejlődését.

A magzati antigéneket felismerve, az anyai limfociták aktiválódnak és klasszikus progeszteron receptorokat expresszálnak [Szekeres-Barthó, és mtsai. 1985; 1989; Roussev és mtsai. 1993], majd progeszteron jelenlétében egy, a progeszteron immunológiai hatásaiért felelős fehérjét PIBF-t termelnek [Szekeres-Barthó, Kilar és mtsai. 1985; Szekeres-Barthó és mtsai. 1989]

A PIBF különböző, terhességhez asszociált szövetekben (deciduában, placentában, az amnionban) [Anderle és mtsai. 2008a], és a szérumban is megjelenik. Szérumkoncentrációja a terhesség alatt folyamatosan növekszik, a szülés megindulásakor pedig hirtelen csökken [Polgár és mtsai. 2004].

A PIBF fehérjét kódoló PIBF1 gén filogenetikailag konzervált, emberben a 13-as, egérben a 14-es kromoszómán található. A PIBF1 gén transzkripciója során 16 különböző mRNS keletkezik, melyek közül a leghosszabb (3677 bázispár) variáns 18 exont tartalmaz, és egy 756 aminosavból álló 90 kDa fehérjét kódol (1. ábra) [Polgár és mtsai. 2003],

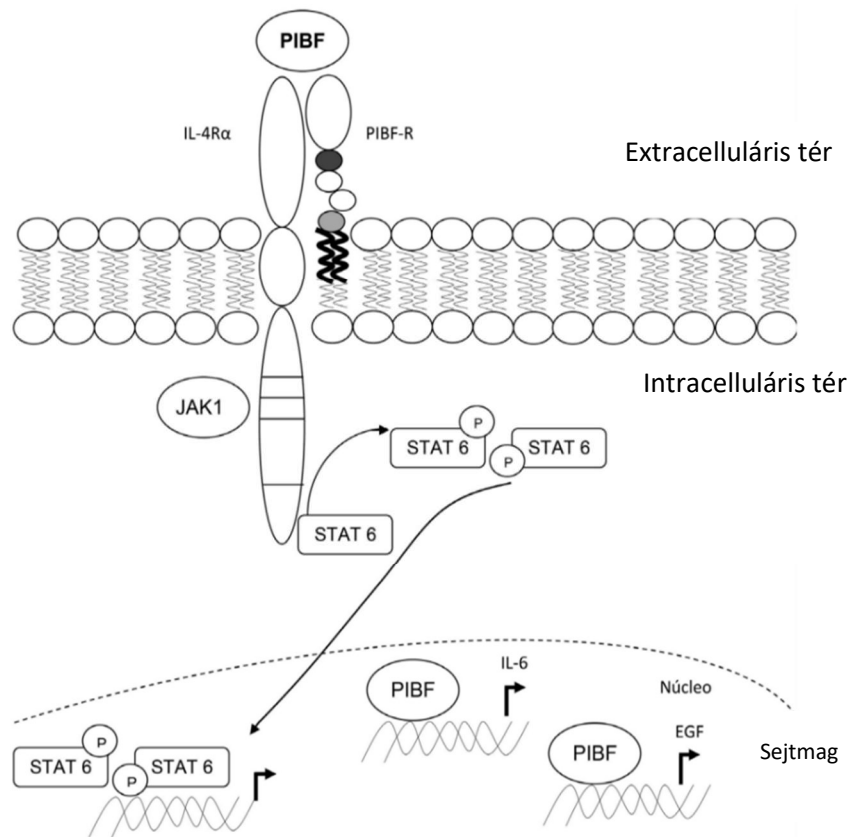
amelyből alternatív splicing révén számos kisebb izoforma is képződik.



1. ábra: Teljes láncú PIBF mRNS szerkezete [Lachmann és mtsai. 2004]

A teljes láncú PIBF, a centroszómális fehérjék (CEP) családjának tagjaként, a pericentrioláris szatellita komplexet alkotó fehérjék egyike, a centroszómához-asszociált formában, konstitutívan jelen van a sejtekben [Lachmann és mtsai. 2004; Kim és mtsai. 2012], míg a kisebb splice-variánsok a citoplazmában helyezkednek el, és szekretálódnak [Lachmann és mtsai. 2004].

A centroszómához asszociált, teljes hosszúságú PIBF feltehetőleg a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet [Kim és mtsai. 2011; 2012], és ez a forma szabályozza a trofoblaszt, és a tumorsejtek inváziós képességét [Halász és mtsai. 2013; Balassa és mtsai. 2018]. A rövidebb, szekretálódó izoformák a sejtől kijutva, a PIBF receptoron keresztül egyrészt a JAK1/STAT6 [Kozma és mtsai. 2006], másrészt a PKC/Ca²⁺ [Kozma, és mtsai. 2006a] jelátviteli utat aktiválják, melynek eredménye a Th2 típusú citokintermelés (2. ábra).



2. ábra: PI3K által aktivált jelátviteli útvonal [Gutiérrez-Rodríguez & Camacho-Arroyo, 2016]

A fentiekből következően a PI3K terhesség során betöltött szerepe rendkívül szerteágazó. A szekretált PI3K az arachidonsav-felszabadulás gátlása mellett [Szekeres-Barthó, és mtsai. 1985] a progeszteron immunmoduláló tulajdonságait közvetíti, melyek közül a legfontosabbak a Th2 citokin-túlsúly kialakítása és az NK aktivitás alacsony szinten tartása.

A normális lefolyású terhességet a beágyazódás közvetlen környezete és a szülés kivételével a Th2 citokinek túlsúlya jellemzi [Wegmann és mtsai. 1993]. A perifériás vérben található citokin mintázat és a terhesség kimenetele közti összefüggést számos adat támasztja alá. Vetélő és koraszülő nők perifériás vérében az egészséges terhesekéhez viszonyítva jelentősen emelkedik a Th1 citokinek szintje [Raghupathy 1997; S. C. Ng és mtsai. 2002; Rezaei és mtsai. 2002]. A PI3K fokozza a Th2 citokinek termelődését [Szekeres-Barthó és mtsai. 1996]. Egy habituális vetélőkön végzett prospektív tanulmány eredményei szerint a

progesztogén terápia hatására keletkező PIBF fokozza a Th2 citokinek termelődését [Raghupathy és mtsai. 2005]. In vivo egérkísérletek is igazolják a Th1 citokin-túlsúly terhességre gyakorolt káros hatását. Terhes egerek interleukin -2 (IL-2), tumor nekrozis faktor α (TNF α) vagy interferon γ (IFN γ) kezelése a terhesség megszakadását eredményezi [Parant, 1990]. Ezzel szemben rezorbcióra hajlamos egértörzsek granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF), interleukin -3 (IL-3), vagy anti- TNF α kezelése csökkenti a magzati veszteséget [Chaouat és mtsai. 1990].

A PIBF szerepet játszik az endometrium implantációra való előkészítésében. Elősegíti a strómasejtek deciduális átalakulását, és hozzájárul ahhoz, hogy a méhnyálkahártya egy rövid ideig (implantációs ablak) alkalmas legyen a megtermékenyült petesejt befogadására. Egérben a PIBF endometriális expressziója az implantációs ablak időszakában a legmagasabb, ami valószínűsíti, hogy a PIBF szerepet játszik a beágyazódás folyamatában [Mulac-Jeričević és mtsai. 2019].

1.2.2. A B- sejtek szerepe a terhességben

A modern immunológiai kutatások egyre inkább rávilágítanak a B- sejtek szerepére az implantációban és a korai terhességben. Ezek a sejtek nem csupán az adaptív immunválasz fontos elemei antitest-termelésük révén, hanem kritikus szerepet játszanak az anyai immunrendszer és a magzati szövetek közötti immunológiai egyensúly fenntartásában is.

Az implantáció során a B- sejtek, különösen a regulációs B- sejtek (Breg sejtek), citokineket, például IL-10-et és TGF- β -t termelnek, amelyek elősegítik a magzattal szembeni immunológiai tolerancia kialakulását és fenntartását [Catalán és mtsai. 2021]. A B-sejtek által termelt citokinek szabályozzák a helyi gyulladásos folyamatokat, ami kulcsfontosságú az implantáció sikeressége szempontjából. Egy speciális populáció, a PIBF

pozitív B- sejtek, kiemelkedő szerepet játszanak az immunológiai tolerancia elősegítésében. A PIBF pozitív B- sejtek elősegítik a Th2 típusú immunválasz dominanciáját [Huang és mtsai. 2017]. IL-10 és TGF- β termelésük révén elősegítik az anti- gyulladáshoz szükséges környezet kialakulását a méhben. [Catalán és mtsai. 2021]

A Breg sejtek diszfunkciója vagy csökkent száma a terhesség korai szakaszában hozzájárulhat olyan komplikációkhoz, mint a spontán vetélés (RSA) [Esteve-Solé és mtsai. 2018]. Ezen túlmenően a B- sejtek szabályozzák a trofoblaszt sejtek inváziós képességét is, közvetlen interakciók révén támogatva az implantáció folyamatát és a placenta fejlődését [Guzman-Genuino és mtsai. 2019].

1.2.3. A T-sejtek szerepe a terhességben

A T- sejtek, különösen a CD4⁺ és CD8⁺ T- sejtek, kritikusak a terhesség alatti immunválasz szabályozásában. A CD4⁺ T-sejtek, az általuk termelt citokineken keresztül koordinálják az immunválaszt, szabályozzák a B- sejtek, makrofágok és más T- sejtek működését. A CD8⁺ T- sejtek, vagy citotoxikus T- sejtek, közvetlenül képesek elpusztítani a fertőzött sejteket és daganatos sejteket.

A T- sejtek aktivációja két fázisban történik. Az első fázisban a T- sejt receptor (TCR) felismeri az antigént, amelyet az antigén-prezentáló sejt (APC) mutat be az MHC (Major Histocompatibility Complex) molekulákon keresztül. A TCR egy heterodimer, amely alfa és béta láncokból áll, és a CD3 komplex közreműködésével továbbítja a jelet a T-sejt belsejébe [Smith-Garvin és mtsai. 2009]. A második fázisban ko-stimulációs jelek szükségesek a T- sejt teljes aktivációjához. A ko-stimuláció főként a CD28 receptoron keresztül történik, amely a T-sejten expresszálódik és az APC által kifejezett CD80 és CD86 molekulákkal lép kölcsönhatásba. A CD28 jelátvitel nélkül a T- sejt anergiás állapotba kerül, inaktívvá válik [Lanier és mtsai. 1995]. A TCR/CD3 komplex és a CD28 receptor

szinergikusan működik, biztosítva a szükséges jeleket az IL-2 termeléshez és a T- sejt proliferációhoz [Smith-Garvin és mtsai. 2009].

A terhesség alatt az anyai immunrendszernek tolerálni kell a magzati antigéneket, egyidejűleg meg kell őriznie a védekezőképességét a fertőzésekkel szemben. A CD4⁺ T- sejtek szabályozzák a Th1/Th2 egyensúlyt [Rautajoki és mtsai., 2008]. A CD8⁺ T- sejtek fontos szerepet játszanak a vírusfertőzések elleni védekezésben a terhesség során. túlzott CD8⁺ T- sejt aktivitás, károsíthatja a magzati szöveteket és komplikációkhoz vezethet [Petroff és mtsai. 2003]. Ezért az immunrendszer finomhangolása és a megfelelő CD4⁺/CD8⁺ T- sejt arány fenntartása kulcsfontosságú a sikeres terhesség érdekében.

1.2.4. Az NK- sejtek szerepe a terhességben

A terhesség korai szakaszában a méhnyálkahártyában (decidua) jelen lévő deciduális NK szerepet játszanak a placenta kialakításában és a magzati fejlődés támogatásában. Ezek a sejtek számos mechanizmus révén segítik a magzat beágyazódását és fejlődését.

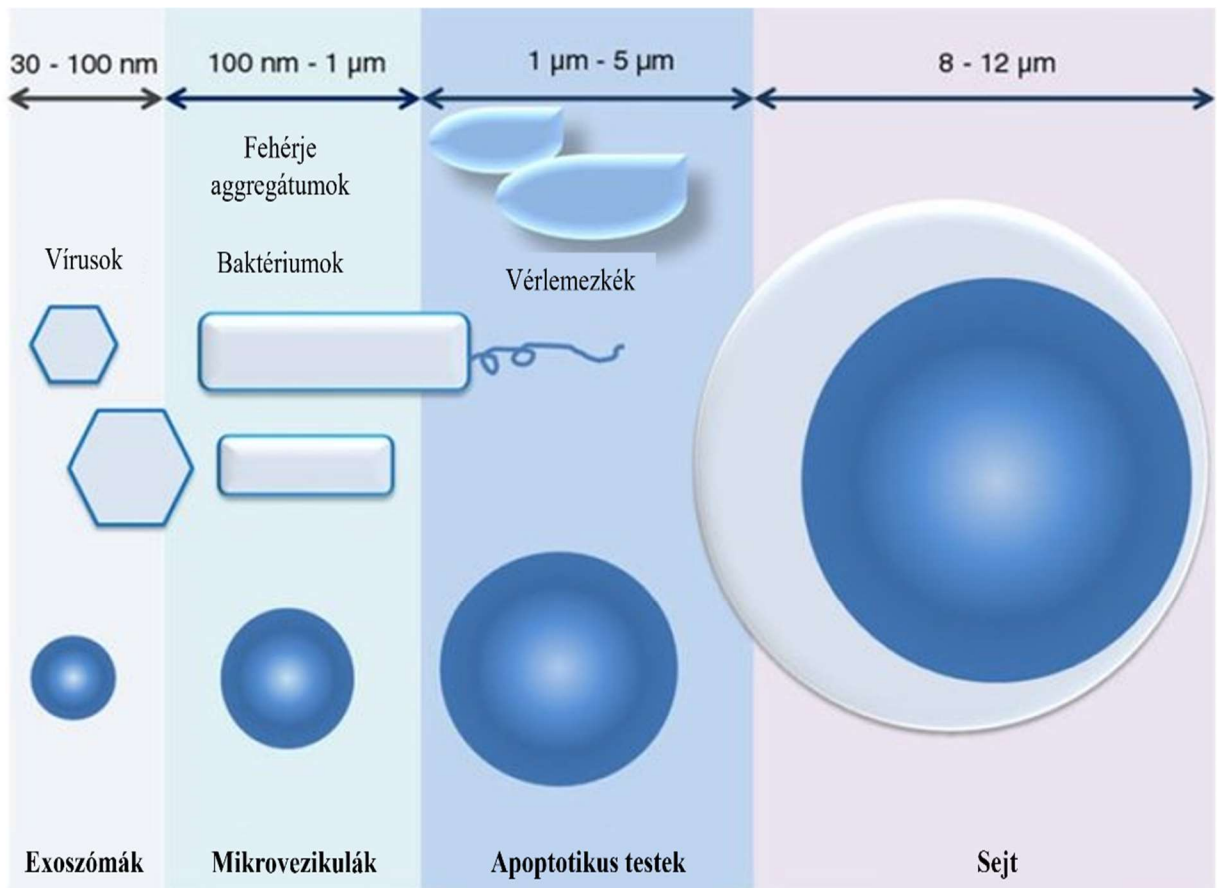
A dNK sejtek egyedi fenotípusuk és funkcióik révén különböznek a perifériás vérben található NK sejtektől. Ezen sejtek fenotípusát a CD56^{bright}/CD16⁻ markerek jellemzik, és nagy mennyiségben termelnek különféle citokineket és kemokineket, amelyek elősegítik a trofoblaszt sejtek invázióját és az anyai érrendszer átalakulását [Moffett-King 2002]. Az interferon-gamma (IFN- γ) és a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α) alapvető szerepet játszanak a spirális artériák átalakulásában, amely lehetővé teszi a magzat számára a megfelelő tápanyag- és oxigénellátást [Ashkar és mtsai. 2000]. A deciduális NK sejtek citotoxikus aktivitása annak ellenére alacsony, hogy keringő társaikhoz hasonlóan citoplazmatikus granulumaikban perforint, granzyme A-t és B-t tartalmaznak [King & Loke 1991; Koopman és mtsai. 2003; Crncic és mtsai. 2005; Quillay és mtsai. 2016]. Bár bizonyos

körülmények között, pl. spontán vetélés alkalmával, ezek a sejtek képesek degranulálódni, normális lefolyású terhességben nem citotoxikusak, aminek egyik oka lehet, hogy a PIBF gátolja citotoxikus molekulák felszabadulását a dNK sejtek granulumaiból [Faust és mtsai. 1999].

Ezen sejtek diszfunkciója komoly következményekkel járhat. Az abnormalis NK sejt aktivitás összefüggésbe hozható különböző terhességi komplikációkkal, mint például a preeklampszia, a vetélés és az intrauterin növekedési retardáció [Quenby és mtsai. 2009]. Azokban az esetekben, amikor az NK sejtek túlzott citotoxicitást mutatnak, a deciduában található trofoblaszt sejtek károsodnak, ami gátolhatja a placenta megfelelő kialakulását és a magzat tápanyagellátását [Hanna és mtsai. 2006].

1.3. Extracelluláris vezikulák

Az embrió, illetve a magzat és az anyai szervezet közötti kommunikáció direkt sejt-sejt kapcsolatok, valamint extracelluláris vezikulák (EV) segítségével valósul meg. Ezeket a kettős foszfolipid membránnal „szállító eszközöket” minden pro-, és eukariota sejt konstitutív módon termeli. Az EV-ket méretük alapján 3 csoportba soroljuk. 100nm alatti átmérővel rendelkeznek az exoszómák, 100- 800nm közöttiek a mikrovezikulák (MV), 1000nm-nél nagyobbak az apoptotikus testek (3. ábra).



3. ábra: Extracelluláris vezikulák típusai és méretbeli eloszlása [György, Szabó, és mtsai. 2011]

Az EV-k különböző molekulákat (DNS, RNS fehérjék, ezen belül MHC molekulák, cytokinek, stb...) tartalmazhatnak. A sejtek közötti információáramlás elősegítésével részt vesznek fiziológiás és patológiás folyamatok szabályozásában ezért diagnosztikus és prognosztikai markerként klinikai jelentőségűek [Zaborowski és mtsai. 2015].

1.3.1. Az extracelluláris vezikulák képződése

Az exoszómák a sejten belül a multivezikuláris testek membránjából képződnek, majd exocitózis útján távoznak a donor sejtől [Subra és mtsai. 2010; Mathivanan és mtsai. 2012; Keerthikumar és mtsai. 2016].

A mikrovezikulák a sejtvez átalakulása, és a szállítandó molekulák beválogatása után fordított lefűzódással keletkeznek. Az apoptotikus testek a programozott sejthalálon áteső sejt feldarabolódása révén jönnek létre. [Coleman és mtsai. 2001]

1.3.2. Az extracelluláris vezikulák kimutatása

Napjainkban is zajlik az EV-k kimutatására és vizsgálatára használt módszerek fejlesztése, illetve standardizálása. A leggyakrabban használt eljárások; a Western blot, a nanoparticle tracking analysis (NTA), az elektronmikroszkópia és az áramlási citometria. Az alkalmazott módszer kiválasztásában jelentős szerepe van a biológiai kérdésfelvetésnek. Más- más módszert kell alkalmazni az EV-k méretének, összetételének, illetve hatásmechanizmusainak vizsgálatára. [Van Der Pol és mtsai. 2010; Zwicker 2010; Van Putten és mtsai. 2011]

1.3.3. Az extracelluláris vezikulák funkciója

Az EV-k tartalmának molekuláris összetétele hasonlít a donor sejtre azonban a szelektív molekula beválogatódás miatt specifikus feladatokat látnak el. Az EV-keket a célsejt különböző módon veheti fel. Történhet membránfúzióval, endocitózissal, valamint receptor-ligand kapcsolódás útján. Az EV-k aktiválhatnak jelátviteli útvonalakat ezzel megváltoztatva a célsejt funkcióját. Fehérjék átadásával megváltozhat a célsejt fenotípusa, valamint genetikai információ transzfer révén genetikai és epigenetikai változásokat (átprogramozás) idézhetnek elő a célsejtben [Zaborowski és mtsai. 2015].

1.3.4. Az extracelluláris vezikulák szerepe a terhességben

Az embrió, ill. a magzat és az anyai szervezet közti párbeszéd részben extracelluláris vezikulák segítségével valósul meg. Az EV-k már a fertilizációban is szerepet játszanak. Az ondófolysadékban található EV-k tartalmazzák a spermiumok túléléséhez és motilitásához

szükséges fruktóz képződéséhez szükséges enzimeket. EV-k hordozzák, majd a spermium membránnal való összeolvadásuk révén kerülnek a spermiumok membránjának felszínére azok a fehérjék (P34H, ADAM7, GP-83) melyek az petesejt és spermium összeolvadásához szükségesek [Frenette és mtsai. 2006; Oh és mtsai. 2009]. Az ondófolyadék EV-i gátolják a limfociták proliferációját, a neutrofil granulociták és monociták fagocitáló aktivitását. Komplement regulátor fehérjét (CD59) adnak át a spermiumoknak, ezzel megakadályozva az anyai komplement aktivációt. Lokálisan gátolják a női genitális traktus alsó részében található NK sejtek aktivációját [Tarazona és mtsai. 2011].

Az EV-k szerepéről a beágyazódás folyamatában jelenleg keveset tudunk. Az anyai endometrium EMMPRIN (CD147) fehérjét tartalmazó EV-eket termel melynek szerepe van az endometrium átépülésében a beágyazódás során [Burnett és mtsai. 2012; Y. H. Ng és mtsai. 2013]. Más sejtekhez hasonlóan, az embrió is termel EV-eket, melyek tartalma egyrészt befolyásolhatja az anyai immunrendszer működését, másrészt az embrió által termelt EV-k olyan jellemzőkkel rendelkezhetnek, melyekből az embrió állapotára lehet következtetni.

Az extravillózus trofoblaszt által termelt vezikulák humán leukocita antigén G (HLA-G) pozitívak és szerepet játszanak az anyai immuntolerancia kialakításában azáltal, hogy szabályozzák a STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) foszforilációt [Pap és mtsai. 2008] csökkentik a CD3- zéta lánc expressziót [Gercel-Taylor és mtsai. 2002] és apoptózist indukálnak [Stenqvist és mtsai. 2013] A trofoblaszt eredetű EV-k csökkentik a lokális CD4+ T- sejtek interleukin 6 (IL-6) iránti érzékenységét [Pállinger és mtsai. 2012].

2. CÉLKITŰZÉSEK

A fentiek alapján célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy:

- Milyen implantációban fontos markerek jelennek meg a pre- implantációs egér embrió különböző stádiumaiban.
- A PIBF milyen mechanizmusokon keresztül segíti elő az implantációt
- Hatással lehetnek-e az embrió-eredetű EV-k az anyai immunválasz alakulására
- Található-e olyan marker a tenyésztett human embriók által termelt EV-kben, melynek alapján kiválasztható az az embrió, amelynek a legjobb az esélye a beágyazódásra.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Az implantációban szerepet játszó molekulák expressziójának vizsgálata in vitro tenyésztett egér embriókban

Másfél napos terhes CD1 egerek (Charles River, Németország) petevezetékének öblítésével kétsejtes embriókat izoláltunk. Az embriókat KSOM (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) médiumban 37°C-on, (5% CO₂, 100% páratartalom) tenyésztettük, majd a 2 sejtes, 4 sejtes, 8 sejtes, morula, és blasztociszta állapot elérése után 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal 25 percig szobahőmérsékleten fixáltuk azokat. Ezután az embriókat cseppben festés módszerrel 8 különböző, az implantáció folyamatában szerepet játszó marker jelenléte szempontjából vizsgáltuk. A jelölési folyamat minden esetben ugyanaz volt csupán az elsődleges antitest változott a különböző markerek vizsgálata érdekében. A fixálást követően az embriókat 3X5 percig foszfát pufferel sóoldatban (PBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mostuk, majd 5 percig 0,5%-os Triton X-100 oldatban permeabilizáltuk. Ezt ismét 3X5 perc mosás követte, majd az endogén peroxidáz enzim aktivitását 3%-os hidrogén-peroxid oldatban 5 percig gátoltuk. Újabb 3X5 perc mosás után a nem specifikus kötőhelyeket 1%-os BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich, USA) tartalmú PBS oldatban 30 percig blokkoltuk. Az 1:50 arányban hígított elsődleges antitestekkel 1 órát, szobahőmérsékleten inkubáltuk az embriókat. A használt elsődleges antitestek a következők voltak: poliklonális nyúl anti-egér VEGF (Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Egyesült Királyság) poliklonális nyúl anti-egér IGF2 (Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Egyesült Királyság), monoklonális nyúl anti-egér PIBF [Polgár és mtsai. 2004], poliklonális nyúl anti-egér LIF (Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Egyesült Királyság), poliklonális nyúl anti-egér PLGF (Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Egyesült Királyság), poliklonális nyúl anti-egér TNF α (Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Egyesült Királyság), poliklonális nyúl anti-egér PAI1 (Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Egyesült Királyság), poliklonális nyúl anti-egér MIF

(Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Egyesült Királyság). Az inkubációt követő 3X5 perc mosás után 1:100 arányban hígított tormagyökér peroxidáz (HRP) enzimmel konjugált kecskében termelt anti- nyúl IgG másodlagos antitesttel (Sigma-Aldrich, USA) 30 percig szobahőmérsékleten kezeltük az embriókat. A reakciót diamino- benzidin (DAB) (DAKO, Glostrup, Dánia) színreakcióval tettük láthatóvá. Az eredményt fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

3.2. PIBF implantációban betöltött szerepének vizsgálata egérmodellben

3.2.1. PIBF biológiai hatásának semlegesítése a peri-implantációs időszakban

egérmodellben

8-12 hetes nőstény CD1 egereket CD1 hímekkel pároztattunk (Charles River, Németország). Másnap reggel vizsgáltuk a vaginális dugó meglétét, és pozitív esetben a terhességi kort 0,5 napnak tekintettük. Az egereket a terhesség 1,5.- és 4,5. napján (az egérben a peri- implantációs időszaknak megfelelő intervallum) 2 μ g 100 μ l PBS oldatban hígított monoklonális nyúl anti- egér PIBF ellenanyaggal [Polgár és mtsai. 2004] kezeltük intraperitoneálisan (i.p.) A kontroll csoportot azonos körülmények között 100 μ l PBS-el oltottuk. Az állatokat a terhesség 10,5 napján cervikális diszlokációval feláldoztuk, majd megszámláltuk az implantációs helyeket. Az izolált decíduák egy részéből immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, a másik részéből az NK sejteket izoláltunk.

3.2.2. Immunhisztokémia

Az izolált implantációs helyeket 6%-os pufferelt formalin oldatban 24 órán keresztül fixáltuk, majd felszálló alkohol sorban dehidráltuk és paraffinba ágyaztuk be. A szövetblokkokból 5 μ m- vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket xilolban deparaffinizáltuk, majd leszálló alkohol sorban rehidráltuk. Az antigénfeltárást citrát pufferrel (pH:6, S1699, DAKO, Glostrup, Dánia) végeztük. Ezután a metszeteket TBS-

TWEEN20 oldatban mostuk 3X5 percig, majd endogén peroxidáz gátlást végeztünk 3%-os hidrogén-peroxid oldattal 20 percig. Ismételt mosás után a nem specifikus kötőhelyeket 3%-os PBS- BSA oldattal blokkoltuk, majd újabb mosás után, 1:25 arányban hígított biotinált monoklonális nyúl anti- egér PIBF-fel [Polgár és mtsai. 2004] egy éjszakán át 4°C-on, majd a következő napon 3X5 perc mosást követően 1:100 arányban hígított HRP konjugált sztreptavidinnel (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) szobahőmérsékleten egy órán át inkubáltuk a metszeteket. A reakciót DAB- bal (DAKO, Glostrup, Dánia) tettük láthatóvá. A sejtmagokat hematoxilinnel (DAKO, Glostrup, Dánia) festettük, majd a metszeteket vizes bázisú fedőanyaggal (DAKO, Glostrup, Dánia) lefedtük. Az eredmények kiértékeléséhez Olympus FV-1000 lézer pásztázó konfokális mikroszkópot használtunk.

3.2.3. Deciduális B- sejtek vizsgálata immunfluoreszcenciával

A B- sejtek azonosításához 1:30 hígítású Alexa647 fluorokrómmal konjugált B220 antitestet alkalmaztunk (Az ellenanyagot a Prof. Dr. Balogh Péter [Pécsi Tudományegyetem, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet] bocsátotta rendelkezésünkre). Az NK- sejtek azonosítása érdekében fluoreszcein- izotiocianát (FITC) konjugált DBA- lektint (Vector Laboratories, Peterborough, Egyesült Királyság) használtunk 1:25-ös hígításban. Az elsődleges antitestekkel a metszeteket egy éjszakán át sötétben 4°C-on inkubáltuk. A sejtmagokat Hoechst33342 -vel (Calbiochem, San Diego, CA, USA) festettük meg. A metszeteket Vectashield médiummal (Vector Laboratories, Peterborough, Egyesült Királyság) fedtük le. A vizsgálathoz Olympus FV-1000 lézer pásztázó konfokális mikroszkópot használtunk.

3.2.4. Deciduális és perifériás limfociták citotoxicitásának mérése

A monoklonális nyúl anti- egér PIBF- el [Polgár és mtsai. 2004] kezelt és a kontroll (PBS- el oltott) egerek deciduáit, valamint lépét a terhesség 10,5. napján steril körülmények között izoláltuk.

Decidua feldolgoása:

A deciduákat apró darabokra vágtuk, majd 10ml 1mg/ml-es steril kollagenáz (collagenase from Clostridium histolyticum, type IV, Sigma-Aldrich, USA) oldatba helyeztük, és 37°C-on keverve inkubáltuk 30 percig. Ezután a szövetdarabkákat 70µm pórusátmérőjű szűrőn (Greiner Bio-One International GmbH, Ausztria) passzíroztuk át. A szűrőt FCS mentes RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékkal átöblítettük. Ezután a végtérfogatot RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékkal 40ml-re egészítettük ki. Centrifugálás után (5 perc, 2000 rpm), a felülúszót leöntöttük és a pelletet 5ml RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) +10% FCS (Gibco, Life technologies, Skócia) +1% P+S (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékkal felfuszpendáltuk, majd 40µm (Greiner Bio-One International GmbH, Ausztria) szűrőn átöntöttük. A sejtszámot 1 millió limfocita/ml re állítottuk be.

Lép feldolgoása:

Az állatok lépét egy 100µm pórusátmérőjű szűrőn (Greiner Bio-One International GmbH, Ausztria) paszíroztuk át. A szűrőt FCS mentes RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékkal átöblítettük, majd a sejtszuszpenziót térfogatát RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékkal 40ml-re egészítettük ki. A csöveket centrifugáltuk, a pelletet 10ml RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékban reszuszpendáltuk majd 70µm- es szűrőn átöntöttük. A limfocitákat Ficoll-

Paque Plus (Cytiva, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) grádiensen izoláltuk. A sejtszámot 1×10^6 /ml -re állítottuk be.

A célsejtek előkészítése:

A frissen passzált egér limfóma a YAC-1 célsejteket RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) + 10% FBS (Gibco, Life technologies, Skócia) + 1% P+S (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékban tenyésztettük. A célsejteket megszámoztuk és a szükséges mennyiséget a gyártó által ajánlott protokoll szerint PKH67 (Sigma- Aldrich, USA) fluoreszcens vitális festékkel festettük meg.

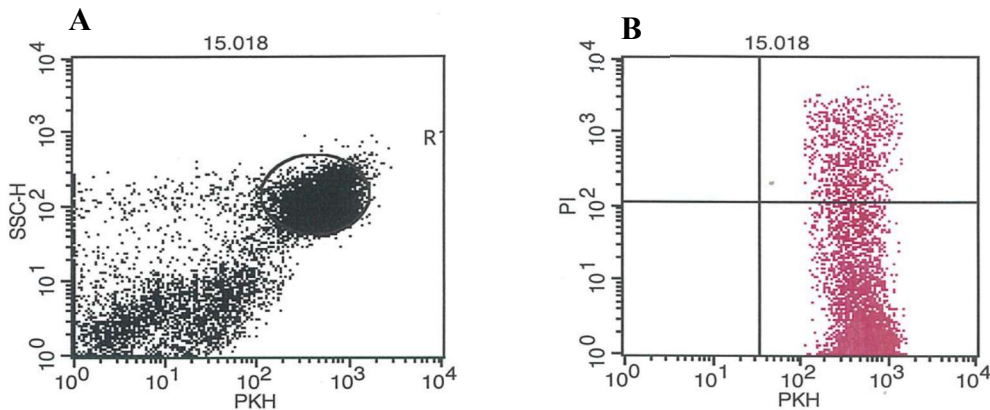
Citotoxicitási teszt:

A limfocitákat 12,5:1 arányban 300 μ l RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) +10% FCS (Gibco, Life technologies, Skócia) +1% P+S (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékban adtuk a PKH67 jelölt YAC-1 célsejtekhez, majd 500rpm-el egy percig centrifugáltuk a sejteket, hogy közel kerülhessenek egymáshoz, és 37°C-on, termosztátban 4 órán át inkubáltuk.

Az inkubációs idő letelte után a csöveket centrifugáltuk (5 perc, 2000 rpm) a felülúszót leöntöttük és 500 μ l RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Skócia) tápfolyadékban szuszpendáltuk fel a sejteket, majd a mintákat 1:500- ra hígított propidium jodiddal (PI) (Sigma- Aldrich, USA) festettük 3 percig. Ezután BD FACSCalibur flow citométer (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) segítségével meghatároztuk a propidium jodid és PKH67 pozitív célsejtek számát (4. ábra).

A kaput a PKH67 pozitív célsejtekre állítottuk be majd ezen belül a mértük az NK sejtek által elpusztított PI+ sejtek számát, melyekből levonásra került az NK sejtek nélküli

spontán elpusztult célsejtek száma. Az eredményeket a Cell Quest Pro software segítségével értékeltük ki. A citotoxicitást PKH67+ sejteken belül az elpusztult PI+ sejtek arányával [(elpusztult jelölt célsejtek/ elpusztult jelölt célsejtek + élő jelölt célsejtek) x 100] - fejeztük ki.



4. ábra: Citotoxicitási teszt során alkalmazott kapuzási stratégia. Az első kaput a PKH67 pozitív célsejtekre állítottuk be (A), majd ezen belül vizsgáltuk a PI pozitív sejtek számát (B).

3.2.5. T- sejt aktivációban és Th1/Th2 differenciálódásban szerepet játszó markerek vizsgálata perifériás limfocitákon

Prime PCR (Bio- Rad Hercules, Kalifornia, USA) teszt segítségével vizsgáltuk az anti-PIBF kezelt és kontroll állatok perifériás CD4+ és CD8+ lépsejtjein a T- sejt aktivációs, valamint a Th1/Th2 differenciációs markereket. A kezelt és kontroll állatok lépeiből a terhesség 10,5. napján limfocitákat izoláltunk, majd Mini-MACS rendszert (Miltenyi Biotec Biotechnology Company, USA) használva, mágneses szeparálással izoláltuk a CD4+ és CD8+ T- sejteket. Az izolált sejteket mostuk, majd a sejtszámokat 5X10⁶/ml-re állítottuk be. Fluoreszcens monoklonális anti- egér CD4 és CD8 antitestekkel jelölt sejteken flow citométer segítségével ellenőriztük az izolálás hatásfokát. Annak érdekében, hogy az RNS

stabil maradjon az izolált CD4+ és CD8+ sejteket RNALater-ICE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oldatban tároltuk felhasználásig. A mintákból a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével, a gyártó által javasolt protokollt követve totál RNS-t izoláltunk. A minták RNS tartalmát Qubit 4 fluoriméterrel mértük meg. Bio-Rad Prime PCR teszttel vizsgáltuk 41 különböző gén expressziójának mértékét a CD4+ és CD8+ sejteken. A kvantitatív real time PCR-t ABI 7900 berendezéssel végeztük.

3.3. Nukleinsav tartalmú extracelluláris vezikulák számának meghatározása 5. napos tenyésztett humán embriók tápfolyadékában

Az in-vitro fertilizációs (IVF) kezelésben résztvevő nőktől származó embriókat egyesével olaj (Ovoil, Vitrolife®, Göteborg, Sweden) alatt G-1 tápfolyadékban (Vitrolife®, Göteborg, Sweden) tenyésztik három napig, majd G-2 tápfolyadékban (Vitrolife®, Göteborg, Sweden) további két napig. Az 5. nap reggelén a tápfolyadékot leszívják és -80°C-on tárolják.

A tenyésztés 5. napján a mikroszkópos morfológia alapján megfelelőnek ítélt embriók beültetésre kerültek. A transzfer után két héttel történt ultrahangos vizsgálattal igazolják az implantáció sikerességét.

3.3.1. Áramlási citometria

A méréseket BD FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) áramlási citométerrel végeztük az adatokat CellQuestPro software segítségével analizáltuk. A beállításhoz és a kapuzáshoz Megamix-Plus SSC gyöngyöket (Biocytex, Franciaország) használtunk. Az EV-k abszolút számának meghatározásakor belső standard gyöngyöket (Sysmex Partec GmbH; Németország) adtunk a kondicionált tápfolyadék mintákhoz. Az EV-k abszolút számát az alábbi képlet segítségével számoltuk:

Abszolút EV szám (EV/ μ L) = (EV események száma/ gyöngy események száma) x gyöngyök koncentrációja (beads/ μ L)

Az embrió-eredetű EV-k nukleinsavtartalmát propidium jodid (PI) festéssel mutattuk ki. Huszonöt μ l embrió tenyésztőfolyadékot 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk 100 μ l 4% paraformaldehiddel (PFA), majd 150 μ l PBS-t és 1 μ l PI oldatot (50 μ g/ml), valamint 50 μ l Count Check gyöngyöt (Sysmex Partec GmbH, Németország) adtunk a mintákhoz. Az áramlási citometriás mérést a PI festés után 30 percen belül végeztük. Az autofluoreszcenciát festetlen mintákkal, a nukleinsav jelölés specificitását PI jelölt üres G-1 és G-2 tápfolyadék mérésével ellenőriztük.

3.3.2. Elektronmikroszkópos feldolgozás, immun elektronmikroszkópia

Öt napos terhes egér endometrium kb. 1 mm³ darabját PBS-el mostuk és egy éjszakán át 4 °C-on 2.5% glutáraldehiddel fixáltuk. Ezután a blokkokat 1% osmium tetroxiddal 1 órán át 4 °C –on tovább fixáltuk, majd etanol növekvő koncentrációival dehidráltuk. A blokkokat kétszer 4 percig propilén oxiddal kezeltük, majd propilén oxid és Durcupan gyanta (Sigma, St Louis, USA) keverékébe merítettük 30 percig. Egy éjszakán át Durcupanban tartottuk a blokkokat, majd Durcupannal töltött zselatin kapszulákba beágyasztuk és 72 órán át 56 °C-on inkubáltuk.

A gyanta polimerizálódása után Leica Ultracut ultramikrotóm (Leica Biosystems, USA) segítségével félvékony metszeteket készítettünk, melyeket toluidin-kékkel festettünk. Ultramikrotómmal sorozatos ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket uranil acetáttal és ólomcitráttal kontrasztosítottunk, majd JEOL 1200EX-II elektron mikroszkóppal (JEOL USA, Inc., MA, USA) vizsgáltunk.

Az embrió által termelt, az embrió környezetében található EV-k PIBF tartalmát immun elektronmikroszkópiával vizsgáltuk. Tenyésztett és 4% formaldehiddel fixált morula stádiumú embriót 1:50 hígítású nyúlban termelt monoklonális anti-PIBF ellenanyaggal reagáltattuk [Polgár és mtsai. 2004] 2 óráig szobahőmérsékleten, majd 1:100 arányban hígított HRP konjugált anti-nyúl IgG ellenanyaggal (DAKO, Glostrup, Dánia) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A reakciót DAB-bal (DAKO, Glostrup, Dánia) tettük láthatóvá. Az immunreakció után az embriókat 3% -os agar oldatba (Sigma, St Louis, USA) ágyasztuk, amelyből megszilárdulás után 1 mm³ méretű blokkokat vágunk és a fent leírtak szerint előkészítettünk elektronmikroszkópos vizsgálatra.

3.4. PIBF + EV-k hatása a CD8+ T- sejtek citokintermelésére

3.4.1. Egér embriók in vitro tenyésztése

8- 12 hetes CD1 nőtény egereket (Charles River, Németország) intraperitoneálisan (i.p.) oltottunk 5NE folliculus stimuláló hormonnal (FSH) (Meriofert, IBSA Pharma, Svájc), majd 48 óra múlva 5NE humán koriogonadotropinnal (hCG) (Choragon, Ferring, Magyarország). Közvetlenül a hCG oltás után a nőtény egereket hímekhez tettük. A vaginális plug észlelését a terhesség 0,5. napjának tekintettük. A plug pozitív egerek petevezetőjéből 2 sejt embriókat öblítettünk a terhesség 1,5. napján, majd in vitro, termosztátban (5% CO₂, 37 C°, 100% páratartalom) egyesével tenyésztettük tovább 50µl-es KSOM (Millipore, Egyesült Királyság) médium cseppben paraffinolajjal (OVOIL, Vitrolife, Svédország) lefedve. Az embriók az izolálás után 72 órával érték el a blasztociszta stádiumot. Az embriókat 24 óránként friss KSOM cseppbe helyeztük. Az utolsó 24 órában az embriók morula stádiumtól blasztociszta stádiumig fejlődnek. Ezt a tápfolyadékot az embrió kivétele után az olaj alól leszívtuk és felhasználásig -80 C°-on tároltuk.

3.4.2. EV-k azonosítása annexin V- el

Az EV-k membránjában expresszáldó foszfatidil szerin (PS) jelölésére fikoeritrin (PE) jelölt annexin V- öt (Sony Biotechnology Inc, USA) használtunk. Az egér embrió tápfolyadékából 2 μ l-t 250 μ l annexin kötő pufferhez adtuk majd 1 μ l PE konjugált annexin V- öt és inkubáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. A keverékhez ezután 50 μ l Count Check gyöngyöt (Sysmex Partec GmbH) adtuk. Az EV-k jelenlétének bizonyítására néhány mintát 0,1% Triton X detergenssel kezeltünk. A detergens feloldja az EV-k membránját ezért a kezelés hatására eltűnt jeleket EV-knek tekinthetjük. [György és mtsai. 2011; Osteikoetxea és mtsai. 2015]. Üres médiumot (embrió nem fejlődött benne, de ugyanúgy volt kezelve) használtunk negatív kontrollként.

3.4.3. EV-k kötődésének vizsgálata egér perifériás limfocitáihoz

Tizenhat hetes CD1 egér lépét izoláltuk majd sejtszuspenziót készítettünk belőle. Ezt 30 μ m pórusátmérőjű Filcon szűrőn (BD Biosciences, San Jose, USA) öntöttük át. A CD4⁺ Th sejteket APC konjugált anti- egér CD4 antitesttel (katalógusszám: 553051 klón: RM4-5 (RUO) BD Biosciences, USA), a CD8⁺ Tc sejteket PECy7 konjugált anti- egér CD8 antitesttel (katalógusszám: 552877, klón: 53-6.7 (RUO), BD Biosciences, USA) jelöltük. A CD4⁺ és CD8⁺ sejtek felszínén expresszáldó foszfatidilszerin receptor (PSR) detektálásához jelöletlen anti- foszfatidilszerin receptor antitestet (katalógusszám: P1495, Sigma, USA), majd FITC konjugált másodlagos antitestet (anti- nyúl IgG) használtunk 1:50-es hígításban. A sejteket az antitestekkel 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Festési kontrollként az elsődleges antitestet kihagytuk a reakcióból. EV-k izolálásához 5db egér embrió tápfolyadékot pooloztunk össze majd 12500g- vel centrifugáltuk (Z 216 M k Microlite centrifuga, 200.88- as rotor, Hermle Labortechnik, Németország) 20 percig 16 C° -on, majd mostuk 12500g-vel 15 percig 16 C°-on. Az Ev-k membránját PKH-26

fluoreszcens festékkel (Sigma, USA) festettük meg a gyártó ajánlása szerint. A PKH-val jelölt EV-ket 96 lyukú lemezen inkubáltuk 5×10^4 CD4 és CD8 jelölt limfocitával, 4% BSA jelenlétében 4 C° -on. A BSA jelenléte megakadályozza, hogy a szabad PKH a limfocitákhoz kössön. Az inkubációs idő után a sejteket PBS-el mostuk, majd áramlási citométerrel (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) mértük. Az eredményeket a CellQuest Pro szoftver (Becton Dickinson, USA) segítségével analizáltuk.

3.4.4. EV-k limfocitákhoz kötődésének megakadályozása

Az EV-k limfocitákhoz kötődésének mechanizmusát vizsgáltuk, oly módon, hogy az embrió eredetű EV-k felszínén megjelenő PS-t annexin V – el (Sony Biotechnology Inc, USA) jelöltük meg, vagy a limfociták külső membránjában megjelenő PSR-t anti- PSR antitettel (Sigma; kat szám: P1495, USA) „takartuk” el. A CD4 és CD8 jelölt limfocitákat $1\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú poliklonális anti- PSR antitessel inkubáltuk 20 percig szobahőmérsékleten.

Az előzőleg PKH-val megjelölt vezikulákat annexin kötő pufferbe vettük fel, majd $1\mu\text{l}$ annexin V- öt adtunk hozzá, majd inkubáltuk 5 percig, szobahőmérsékleten.

Az PKH festett embrió eredetű vezikulákat (annexin V- el kezelt vagy nem kezelt) 30 percig inkubáltuk kezeletlen vagy anti- PSR kezelt limfocitákkal 30 percig 4 C° - on. A CD4+ illetve a CD8+ limfocitákon megjelenő PKH jeleket vizsgáltuk áramlási citométerrel.

3.4.5. Limfociták IL-10 termelésének vizsgálata

Ötszázezer limfocitát stimuláltunk embrió eredetű EV-kel protein transzport inhibitor brefeldin A (Sigma, USA) jelenlétében 4 órán át termosztátban. A stimulált sejteket ezután mostuk, majd $50\mu\text{l}$ jelölő pufferben (1% BSA/PBS) vettük fel. A jelölő puffer optimálisan titrált mennyiségben tartalmazta a következő antitesteket: monoklonális APC-

konjugált patkány anti- egér CD4 (APC Rat Anti-Mouse CD4 Clone RM4-5 (RUO) 553051, BD Biosciences, USA) és monoklonális PECy™7- konjugált patkány anti- egér CD8 (PE-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD8a Clone 53-6.7 (RUO) 552877, BD Biosciences, USA). A sejteket 30 percig inkubáltuk az ellenanyagokkal szobahőmérsékleten. Ezután a CD4 és CD8 jelölt sejteket 4%-os PFA- ban fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. Fixálás után a limfocitákat permeabilizáltuk 0,1%-os szaponinnal majd 50µl- es jelölő pufferben (1% BSA/PBS) festettük megfelelően titrált monoklonális PE- konjugált patkány anti- egér IL-10 antitesttel (PE Rat Anti-Mouse IL-10 Clone JES5-16E3 (RUO) 561060, BD Biosciences, USA) 30 percig szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő után a sejteket 2ml PBS el mostuk, majd centrifugáltuk 5 percig 300g-n, a felülúszót leöntöttük és a pelletet 300µl 2%-os paraformaldehid (Sigma, USA) oldatban vettük fel. A jelölt sejtek a mérés elkezdéséig 4 C°-on tároltuk sötétben. A teszt során az áramlási citométerrel 5×10^4 sejtet mértünk le csövenként. Az adatokat a CellQuestPro szoftver (Becton Dickinson, USA) segítségével elemeztük.

Az eredmények statisztikai analízisére kétmintás t próbát alkalmaztunk. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.,

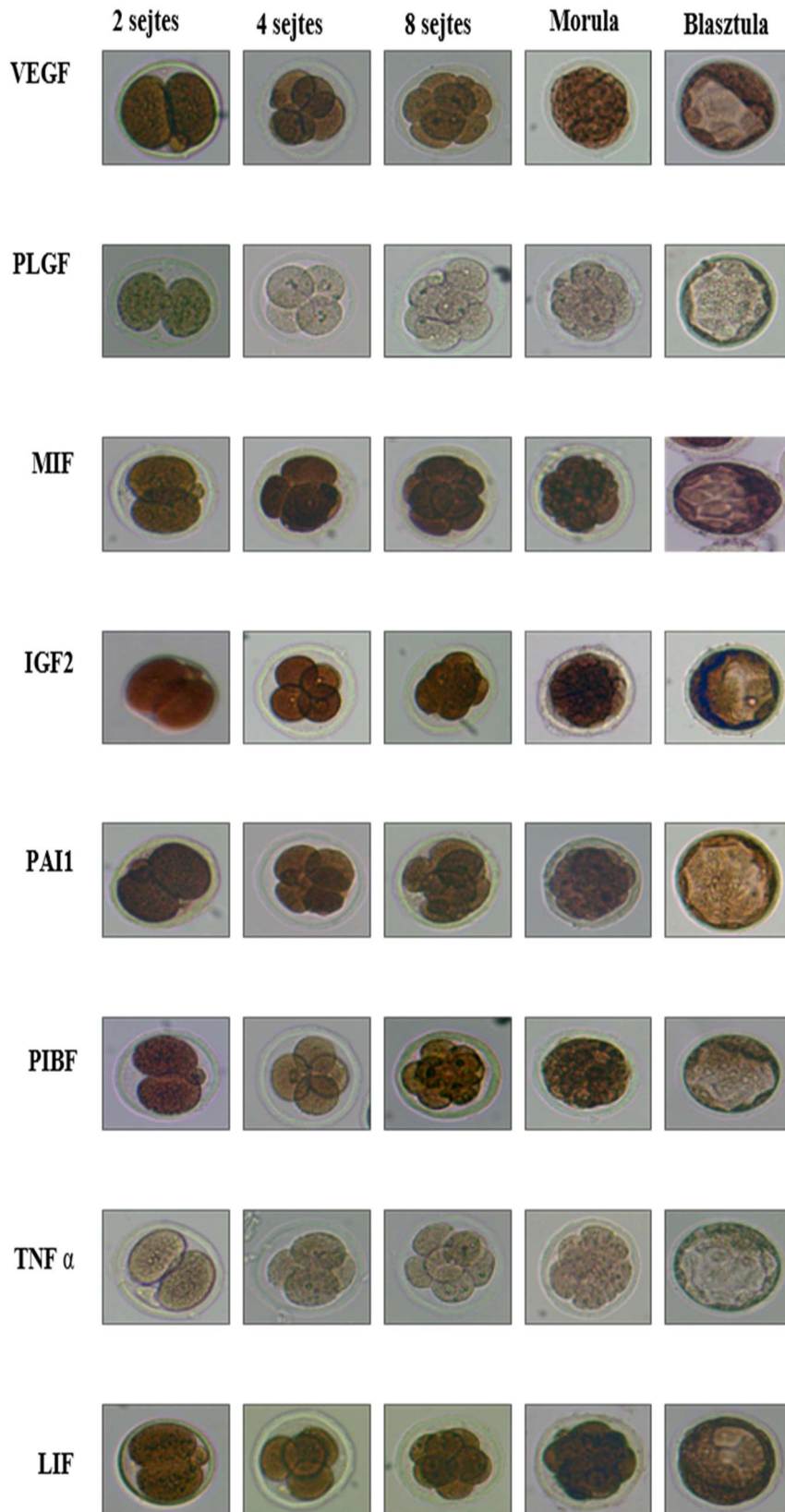
3.5. Etikai engedély

Minden módszert és kísérleti protokollt a Baranya megyei Állategészségügyi Bizottság által kiadott engedély (BAI/35/859-6/2019) birtokában, a releváns irányelvek és szabályok betartása szerint végeztünk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az implantáció során szerepet játszó markerek megjelenése a tenyésztett egér embriókban

Nyolc különböző, az irodalmi adatok alapján az implantáció és a terhesség során fontos szerepet játszó marker jelenlétét vizsgáltuk 2, 4, 8 sejtes, morula és blasztociszta stádiumban levő egér embriókban. Az embriók minden vizsgált fejlődési stádiumban erősen expresszálják a VEGF, IGF2, MIF, PAI1, LIF és PIBF markeret. Nem expresszálják viszont a PLGF- et és a TNF α - át (5. ábra).

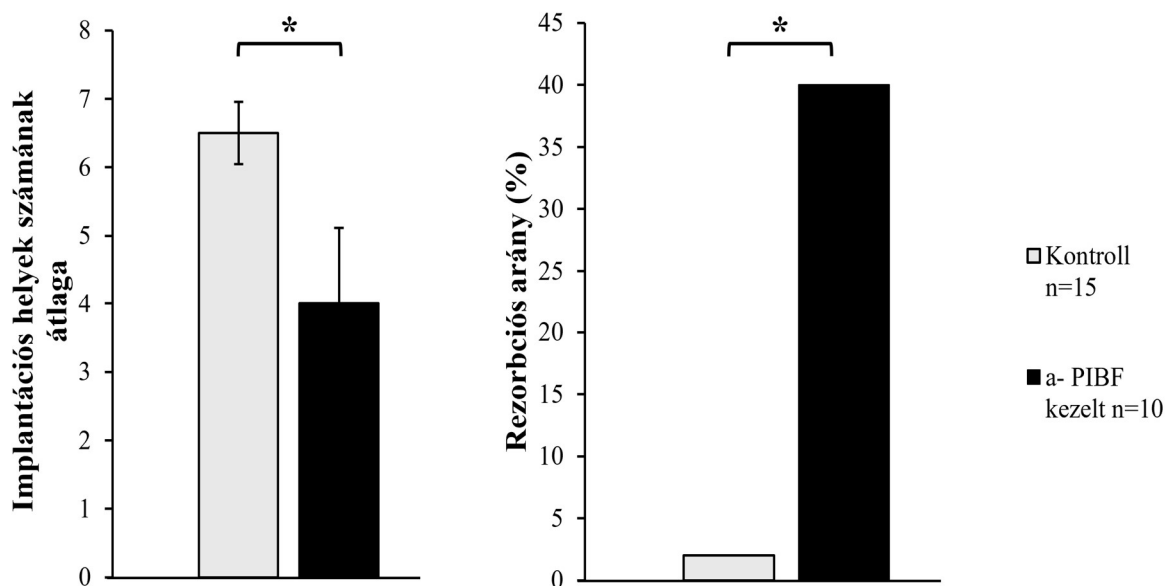


5. ábra: Az implantációban szerepet játszó molekulák megjelenése különböző fejlettségű tenyésztett egér embriókban. (immunhisztológia, 200x)

4.2. A PIBF implantációban betöltött szerepének vizsgálata egérmodellben

4.2.1. A peri- implantációs időszakban történő anti- PIBF kezelés csökkenti a beágyazódott embriók számát és növeli a rezorpciós arányt

Az egereket a terhesség 1,5 és 4,5. napján anti- egér PIBF ellenanyaggal kezeltük, ezzel semlegesítve a PIBF biológiai hatását az implantációs ablak alatt. Az egereket a terhesség 10,5. napján dolgoztuk fel, mert ez időpont alkalmas volt arra, hogy nem csupán az implantációs helyeket, de a rezorbeálódott embriók arányát is meg tudjuk állapítani. A kontroll (PBS- sel kezelt) állatokban az implantációs helyek átlagos száma 6,5 volt, míg az anti- PIBF-fel kezeltékben csupán 4. Azok az embriók, melyek a PIBF hiányában is beágyazódtak, a későbbiekben elpusztultak. A kontroll egerekben megfigyelt 2% rezorpciós arány a PIBF hiányos egerekben 40%-ra nőtt (6. ábra).



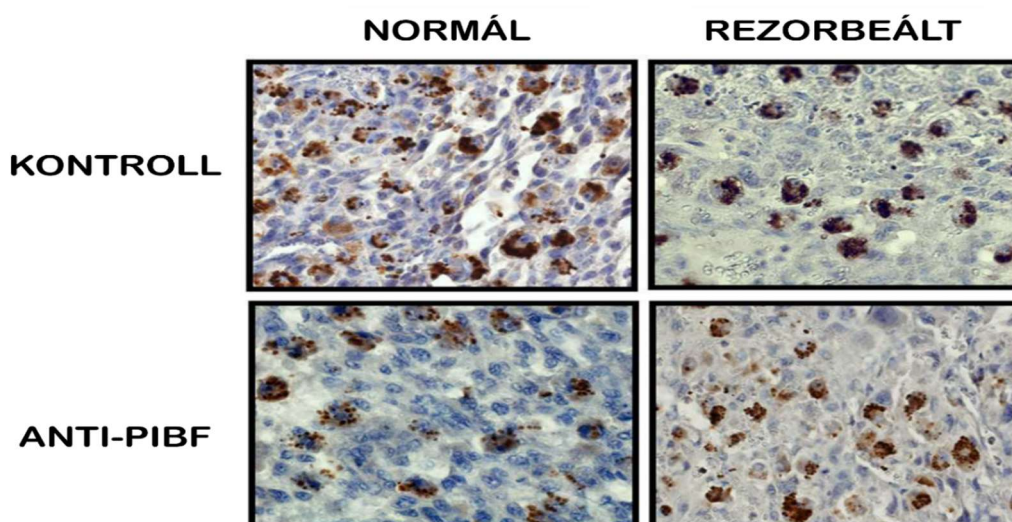
6. ábra: Implantációs és rezorpciós arány PIBF deficiens és kontroll egerekben. Az oszlopok 10 (anti- PIBF kezelt), ill. 15 (kontroll) egér eredményeinek átlagát +/- SE mutatják. *p <0,05

PIBF hiányos egerekben csökken az implantációs- és fokozott a rezorpciós arány. CD1 egereket a terhesség 2,5 és 4,5 napján i.p. monoklonális anti- PIBF ellenanyaggal, a kontrollokat azonos körülmények között PBS-el oltottunk. A terhesség 10,5. napján meghatároztuk az implantációs helyek számát és a rezorpciós arányt.

Ezen jelenség hátterének tisztázása érdekében vizsgáltuk a deciduában található immunsejtek összetételének, és az immunválasz egyes elemeinek változását PIBF hiányos egerekben.

4.2.2. Az anti- PIBF kezelés hatására csökken a PIBF⁺ deciduális NK sejtek száma

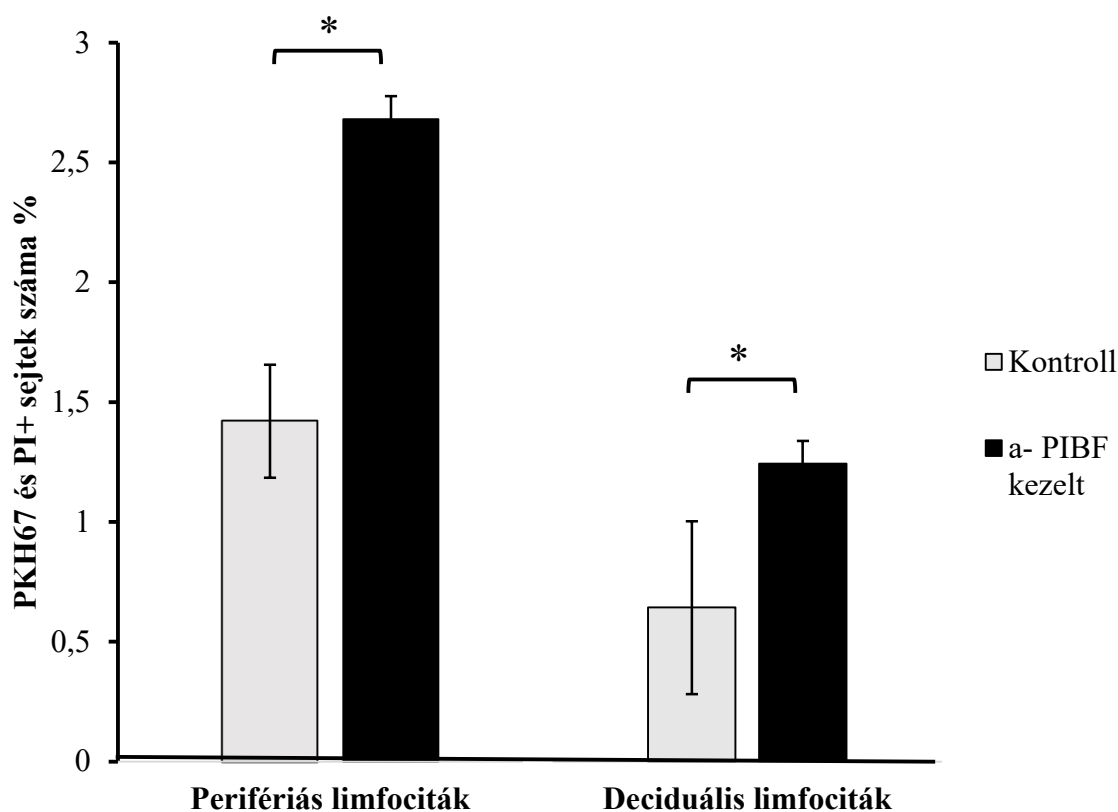
Bogdán és mtsai. egészséges terhes egerek deciduális NK sejtjeinek citoplazmatikus granulumában a perforinnal ko-lokalizációban PIBF-t mutattak ki [Bogdán és mtsai. 2017]. Az anti- PIBF-fel kezelt egerek deciduájában szignifikánsan alacsonyabb számú PIBF pozitív NK sejtet találtunk a kontrollhoz képest. A kontroll egerek spontán rezorbeálódott embrióinak deciduájában hasonlóképpen csökkent számú PIBF+ NK sejtet találunk, ami arra enged következtetni, hogy a rezorbcio PIBF+ limfociták hiányára vezethető vissza (7. ábra).



7. ábra: PIBF⁺ NK sejtek immunhisztológiai kimutatása 10,5 napos normál és rezorbeált magzatok deciduájában kontroll és anti- PIBF kezelt állatokban (400x).

4.2.3. A deciduális és perifériás NK sejtek citotoxicitása anti-PIBF kezelt és kontroll egerekben

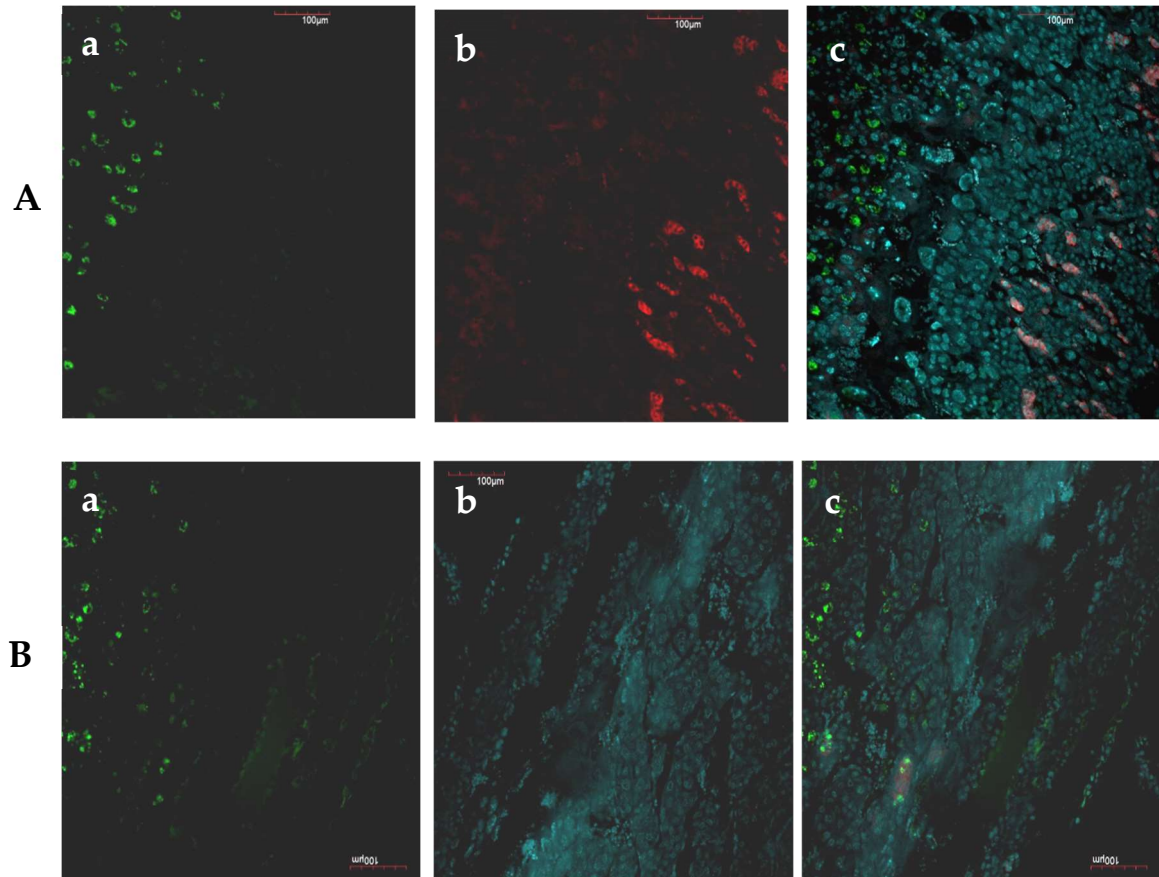
A peri implantációs időszakban alkalmazott anti- PIBF kezelés a kontrollhoz képest szignifikánsan fokozta mind a perifériás, mind a deciduális NK sejtek citotoxikus aktivitását (8. ábra).



8. ábra: PIBF hiányos egerek deciduális és keringő NK sejtjeinek citotoxikus aktivitása. A citotoxikus aktivitás meghatározása áramlási citometriával történt. A PKH-67-al jelölt célsejteket a limfocitákkal való négy órás inkubáció után propidium jodiddal jelöltük, a károsodott és élő célsejtek elkülönítése céljából. A citotoxicitást PKH-67+ sejteken belül az elpusztult PI+ sejtek arányával [(elpusztult jelölt célsejtek/ elpusztult jelölt célsejtek + élő jelölt célsejtek) x 100] - fejeztük ki. Az oszlopok 6 független meghatározás átlagát +/-SEM mutatják. *p <0,05

4.2.4. Deciduális B- sejtek az anti-PIBF kezelés hatására depletálódtak

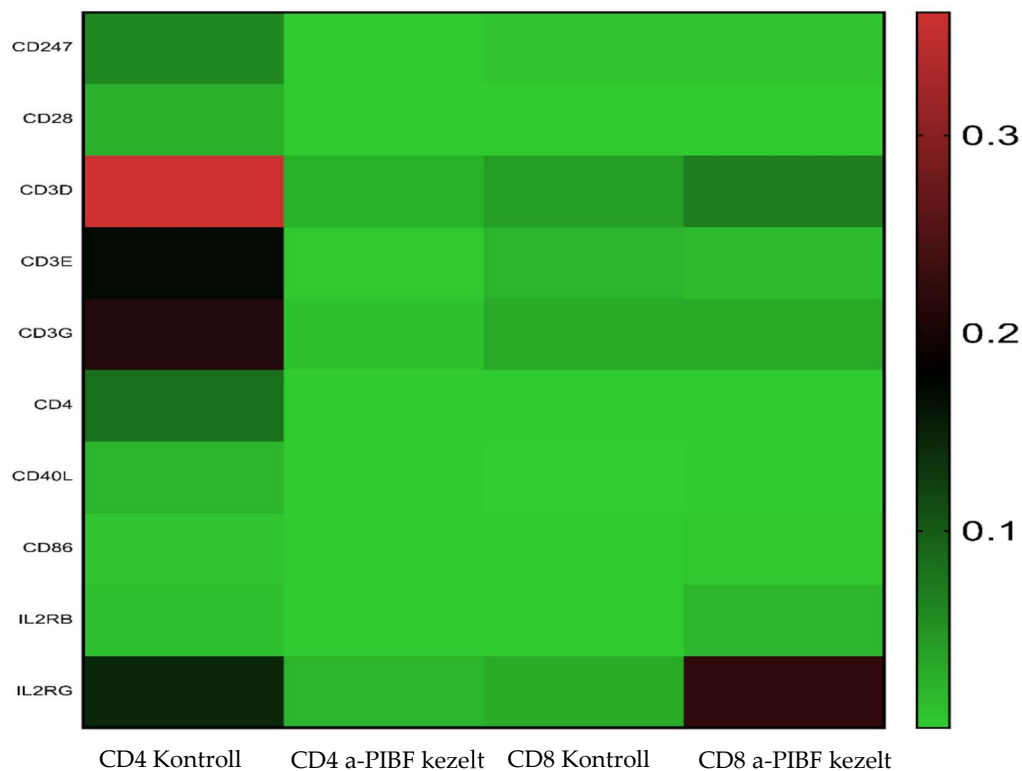
A kontroll állatok decíduájában a korio- deciduális rétegben alacsony számú B- sejt található, melyek az anti- PIBF-fel kezelt állatok decíduáiban nincsenek jelen (9. ábra).



9. ábra: Deciduális B sejtek a kontroll (A) és anti- PIBF kezelt (B) egerek decíduájában. A B sejteket, Alexa Fluor 647 -el konjugált anti- egér B220 IgG-vel reagáltattuk (vörös fluoreszcencia) az NK sejteket pedig FITC-konjugált DBA lektinnel (zöld fluoreszcencia) jelöltük. A kontroll egerekben az NK sejtek (A panel a és c) a decíduában, a B sejtek pedig (A panel b és c) a korio-deciduális határon helyezkednek el. Az anti- PIBF kezelt egerek decíduájában az NK sejtek jelen vannak (B panel a és c), a B sejtek azonban hiányoznak (B panel b és c). a: NK sejtek (FITC) b: B sejtek (Alexa Fluor 647) c: Merged. (200X)

4.2.5. A peri-implantációs időszakban PIBF hiányos egerek CD4+ T- sejtjein az aktivációhoz szükséges gének csökkent mértékben expresszálódnak és a T- sejtek Th1 irányba differenciálódnak

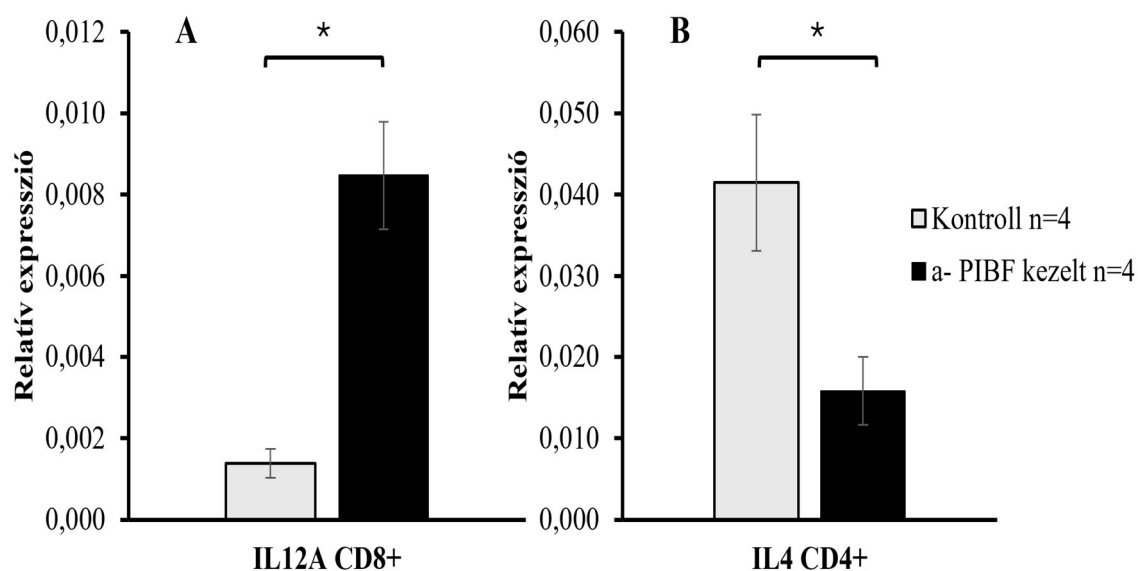
Prime PCR tesztel vizsgáltuk 48 különböző gén expressziójának mértékét a PIBF hiányos és a kontroll egerek perifériás limfocitáin. A vizsgált géneket 3 csoportra lehetett osztani; a T- sejt aktivációban-, a Th1 irányú differenciálódásban-, és a Th2 irányú differenciálódásban szerepet játszó génekre. A T- sejt aktivációban szerepet játszó CD3 komplex tagjai (CD247, CD3D, E és G, IL2RG), valamint a ko-stimulációért felelős CD4, CD28 CD40L és CD86 gének a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszálódtak a PIBF hiányos állatok CD4+ sejtjeiben, de magasabb expressziós szintet mutattak a kezelt állatok CD8+ limfocitáiban (10. ábra).



10. ábra: A T- sejt aktiválódásban szerepet játszó gének kifejeződése anti- PIBF kezelt és kontroll terhes egerek CD4+ és CD8+ T lépsejtjein.

A hőtésképen látható, hogy mind a CD3 komplex összetevői, mind a ko-stimulációs molekulák csökkent mértékben fejeződnek ki PIBF-deficiens egerek CD4+ T- sejtjein, míg néhányan upregulálódnak a CD8+ sejteken. A hőtésképen az alacsony értékeket zöld, a magasakat piros szín jelzi. Valamennyi adat szignifikánsan ($p < 0,05$) különbözik a kontroll értékektől.

A PIBF hiányos egerek CD4+ sejtjein az IL-4 mRNS expressziója csökkent (11. ábra), míg a CD8+ populációban megnőtt az IL-2R gamma lánc (10. ábra) és az IL-12A mRNS expressziója (11. ábra).



11. ábra: A Th1/Th2 differenciálódásban szerepet játszó gének expressziója kontroll és anti-PIBF kezelt egerekben. A) Az anti- PIBF kezelt egerek CD8+ sejtjeiben szignifikánsan magasabb az IL-12A mRNA expressziója. B) Az anti- PIBF kezelt egerek CD4+ sejtjeiben szignifikánsan csökkent az IL-4 mRNS expressziója. Az oszlopok 4 kísérlet eredményének átlagát +/-SEM mutatják. * $p < 0,05$

Az eredmények alapján az anti- PIBF kezelés gátolja a CD4+ sejtek, és serkenti a CD8+ T- sejtek aktivációját.

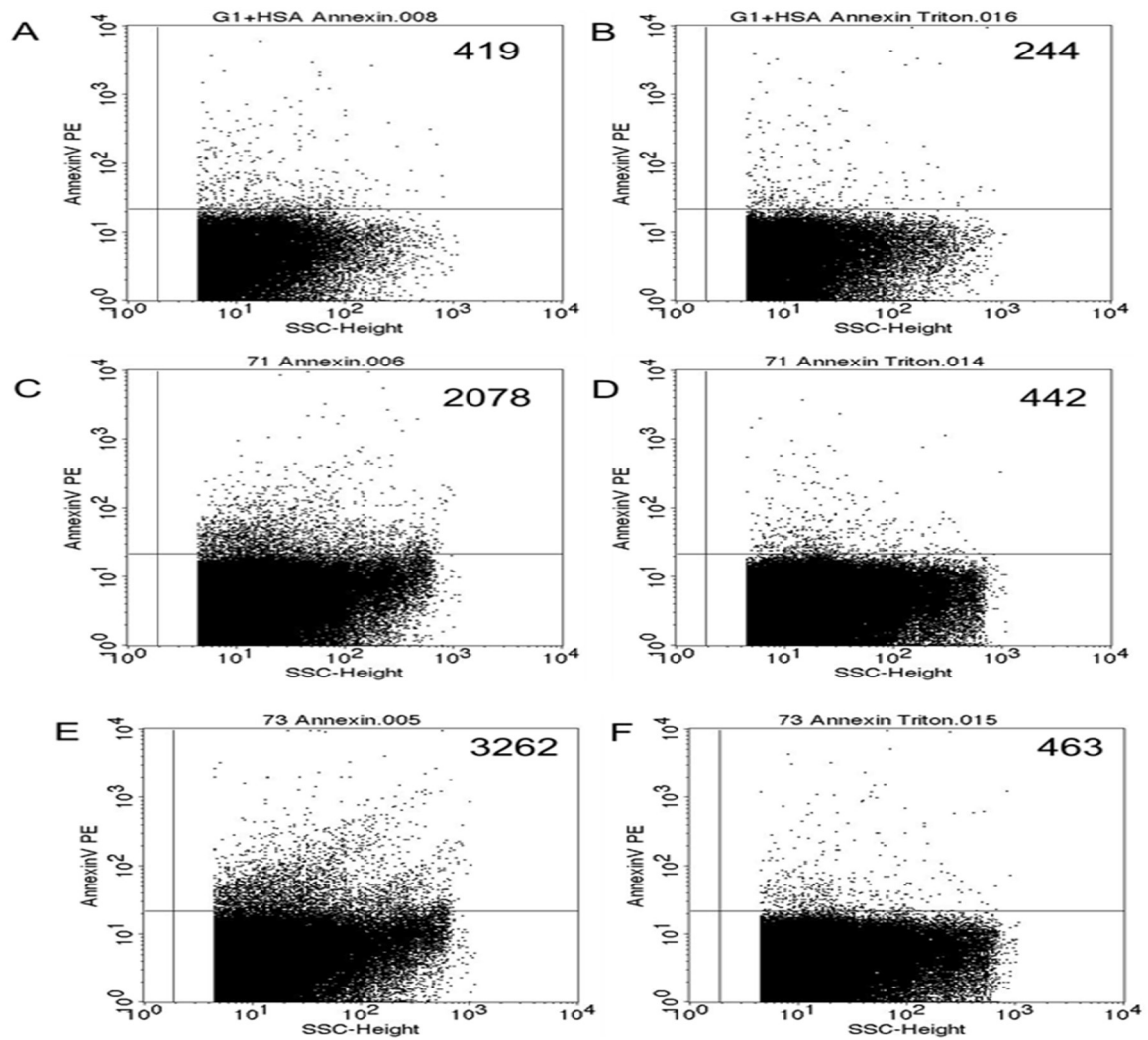
4.3. PIBF+ EV-k hatása perifériás limfociták citokintermelésére

4.3.1. Embrió eredetű EV-k kimutatása annexin V- el

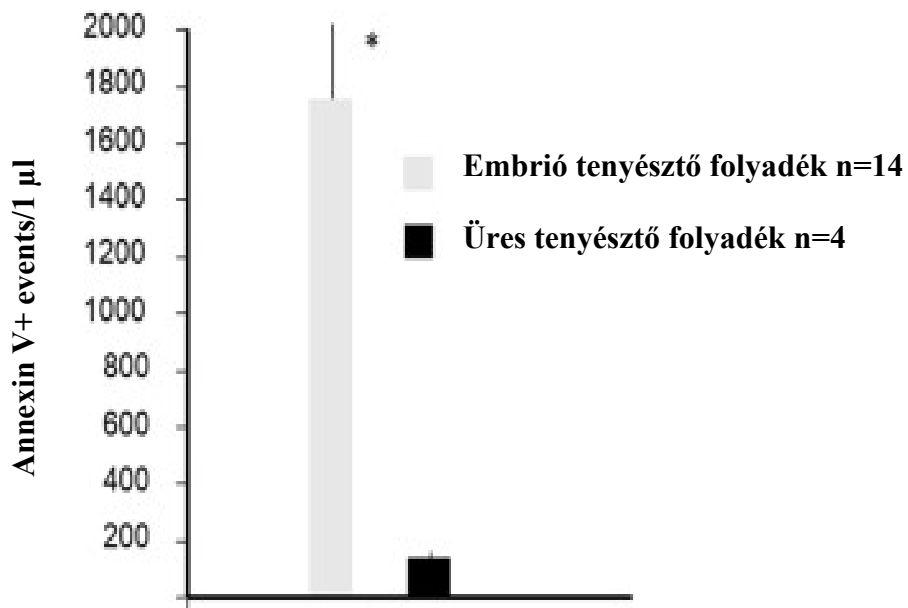
Az egér embriók extracelluláris vezikulumokat termelnek. Az egér embrió tápfolyadékában lévő embrió-eredetű EV-eket az annexin V kötőképességük alapján azonosítottuk, áramlási citometriával. Annexin V-t tartalmazó üres tápfolyadék (embrió nem fejlődött benne) használtunk a nem specifikus fluoreszcencia háttér mérésére (12. ábra/A). Az annexin V pozitív események száma magasabb volt az embrió tápfolyadékban (12. ábra/ C, E), mint az üres tápfolyadékban (12. ábra/A). Az annexin V pozitív EV-k eltűntek a minták Triton-X kezelése után (12. ábra/D, F), míg az üres tápfolyadék nem specifikus fluoreszcencia háttere nem volt érzékeny a Triton-X függő lízisre (12. ábra/B). A további kísérletekben azokat az eseményeket tekintettük EV-knek, amelyek érzékenyek voltak a 0,1%-os Triton-X 100 kezelésre.

Az 14 embrió tápfolyadéka és 4 üres tápfolyadék elemzése jelentős különbséget mutatott ($p < 0,001$) az annexin V+ és a TritonX-függő lízisre érzékeny EV-k számában (13. ábra).

Ezek az adatok megerősítik, hogy a tenyésztett embrió kimutatható mennyiségű EV-t termel, és az annexin V jelölés megbízható módszer az embrió-eredetű EV-k kimutatásának.



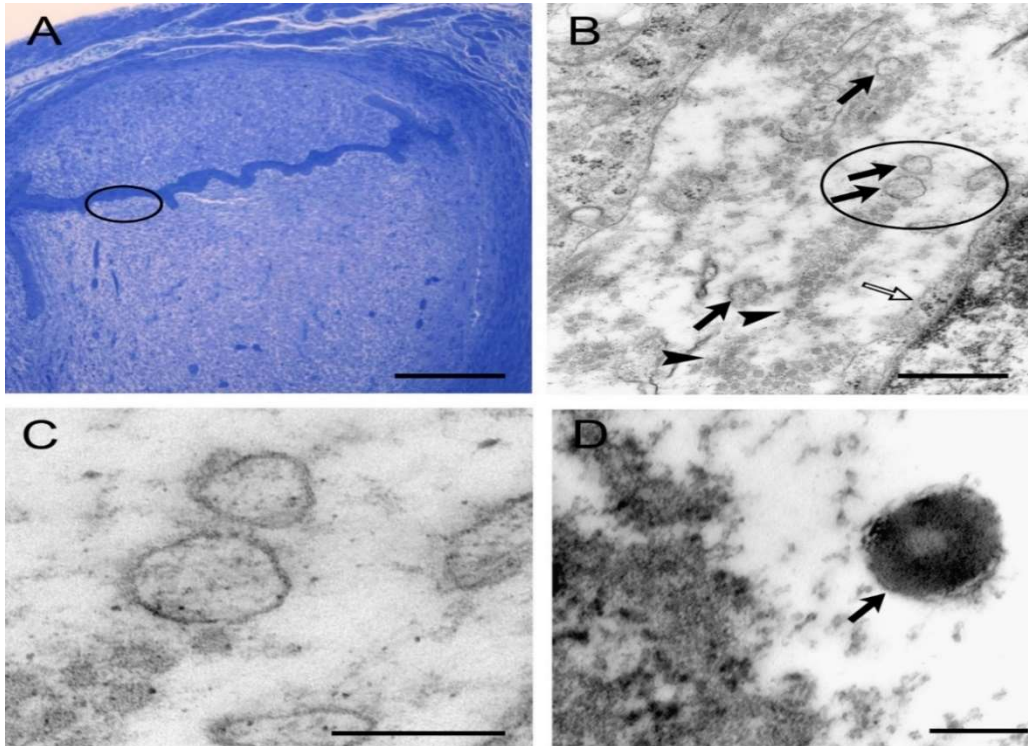
12. ábra: Extracelluláris vezikulák embriók tenyésztőfolyadékában. Az egér embrió tápfolyadékában lévő EV-kat az annexin V kötő képességük alapján azonosítottuk áramlási citometria segítségével. A nem specifikus festődés mérésére annexinV -tel jelölt üres tápfolyadékot használtunk (nem fejlődött benne embrió). Az EV-k jelenlétét detergens lízissel igazoltuk. Annexin V pozitív EV-k két reprezentatív embriótenyésztő tápfolyadékban és egy üres tápoldatban. (A) Annexin V pozitív EV-k üres tápfolyadékban. (C, E) Annexin V pozitív EV-k az egér embrió tápfolyadékában. (D, F) Az annexin V pozitív EV-k eltűnnek a TritonX kezelés után. (B) Az üres tápközegben lévő háttér nem érzékeny a Triton X-függő lízisre. A panel jobb felső negyedében lévő számok az egy mérés során észlelt annexin V+ események számát mutatják.



13. ábra: Az annexin V- tel jelölt Ev/µl száma 14 egyedi embriótenyésztő tápközegben és 4 üres tápfolyadékban. Az oszlopok 14, illetve 4 kísérlet átlagos +/- SEM értékét jelentik *p < 0,001.

4.3.2. Az embrió eredetű EV-k PIBF-t tartalmaznak

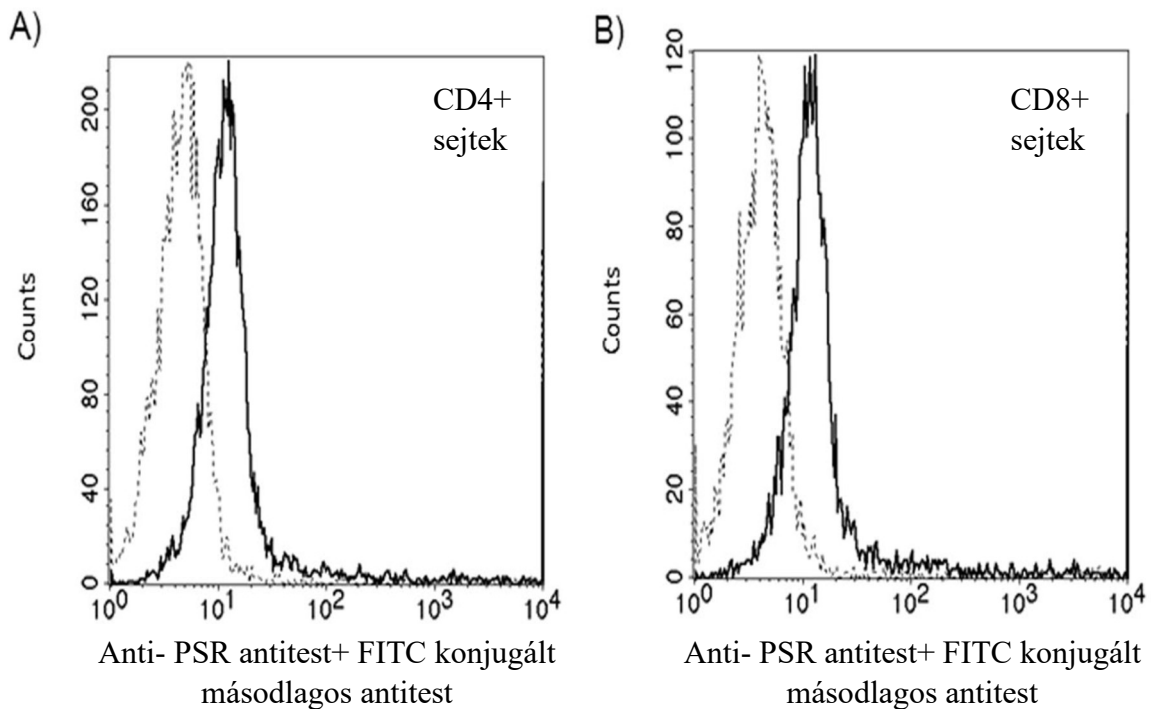
A preimplantációs egér embrió PIBF-t expresszál (5.ábra). Immun - elektronmikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy az embrió által termelt EV-kben is megtalálható a PIBF (14. ábra).



14. ábra: Extracelluláris vezikulák a beágyazódott embrió és a maternális oldal közti részben. A) 5. napos implantantációs hely egér endometriumban (félvékony metszet). A bekarikázott terület nagyítva látható a B ábrán. Scale bar=200 μm. B) Az embrió-maternális határfelület kis nagyítású elektronmikroszkópos képe. Az extracelluláris vezikulákat nyilak jelölik. A bekarikázott terület nagyobb nagyítással látható a C ábrán. (Scale bar= 20 μm C, Scale bar = 500 nm. D) In vitro tenyésztett morula stádiumban levő egér embriót anti PIBF ellenanyaggal festettük, majd agarba beágyaztuk és elektronmikroszkópiára előkészítettük. Az embrió által termelt EV (nyíl) PIBF-t tartalmaz. Scale bar = 200 nm.

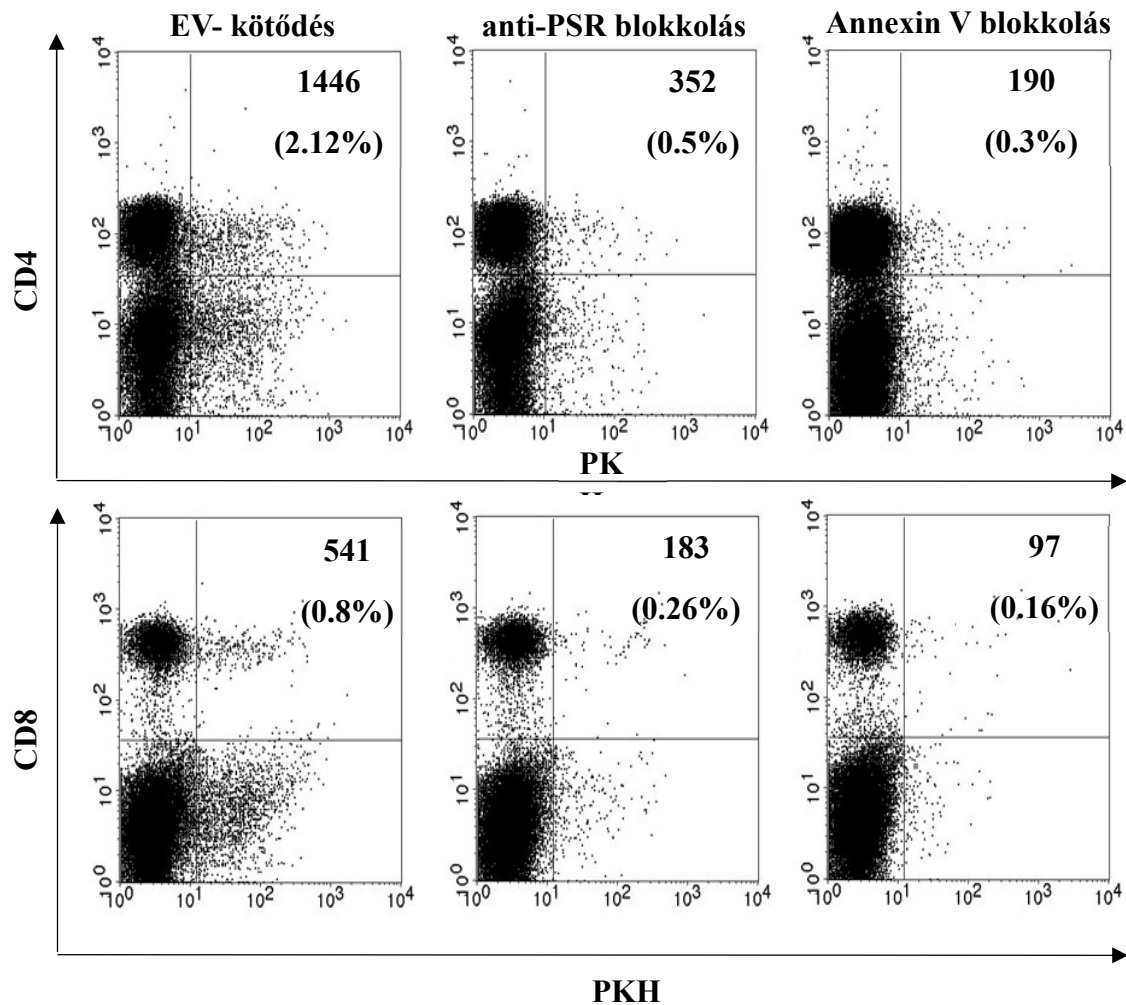
4.3.3. Az embrió eredetű EV-k foszfatidil- szerinen keresztül kötődnek a perifériás limfocitákhoz

Az egér embrió-eredetű extracelluláris vezikulumok a foszfatidil-szerin révén kötődnek az egér lép sejtjeihez. Az EV-k kötődését egér lép sejtekhez áramlási citometriával igazoltuk. A sejteket méret (FS) és granularitás (SS) alapján limfocitákra és nem limfoid sejtekre osztottuk. Az egér embrió-eredetű EV-k kötődnek mind a CD4+ mind a CD8+ T-



16. ábra: CD4+ (A) és CD8+ (B) sejtek foszfatidil- szerin receptor expressziója

Ezért vizsgáltuk a foszfatidil szerin-foszfatidil szerin receptor kölcsönhatás szerepét az embrió-eredetű EV-k T- sejtekhez való kötődésében. Mielőtt az embrió-eredetű EV-eket immun-fenotipizált lépsejtekkel inkubáltuk volna, „letakartuk” az embrió-eredetű EV-k exofaciális foszfatidil-szerin kötőhelyeit annexinV-tel, vagy a limfociták foszfatidil-szerin receptorait foszfatidil-szerin receptorra specifikus monoklonális antitestekkel, és ellenőriztük a CD4+ és CD8+ sejtekhez kötődő EV-k számát. Mindkét esetben részben gátolták a PKH-jelölt, embrió-eredetű EV-k kötődését. Ezeket a kísérleteket 4-szer ismételtük meg, és jelentős ($p = 0,05$) csökkenést mutattunk ki a sejtekhez kötődő EV-k számában az anti- PSR vagy az annexin V blokkolását követően (17. ábra). Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a PSR lehet az egyik cél- kötőhelye az embrió-eredetű EV-knek.

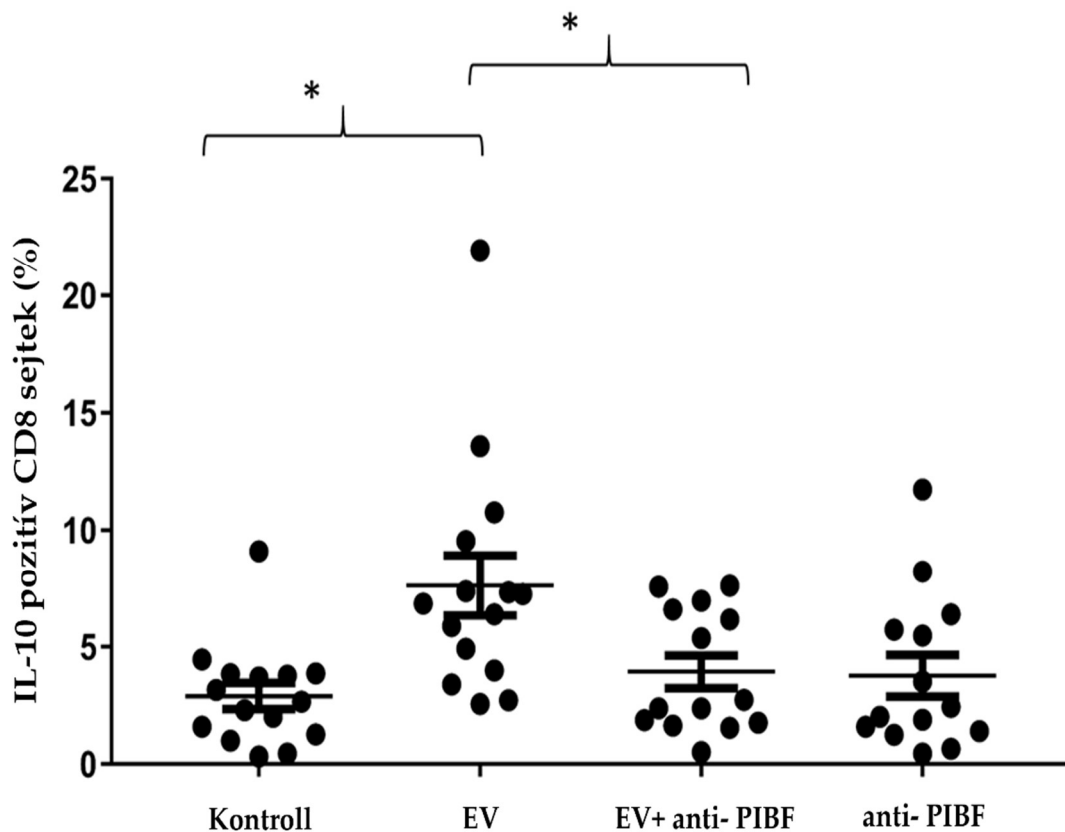


17. ábra: Az embrió-eredetű extracelluláris vezikulumok (EV) exofaciális foszfatidil-szerin kötőhelyeinek blokkolása gátolja az EV-k kötődését a limfocitákhoz. Mielőtt az embrió-eredetű EV-eket anti- CD4 és anti- CD8 jelzett lépsejtekkel inkubáltuk volna, maszkoltuk a foszfatidil-szerint az EV-k membránjain az annexin V-vel, vagy a limfociták foszfatidil-szerin receptorait, és ellenőriztük az EV-k CD4+ és CD8+ sejtekhez kötődésének számát. A. panel: A reprezentatív dot plotok jobb felső negyedeiben láthatók a PKH+/CD4+ vagy PKH+/CD8+ duplán pozitív sejtek. Ezek a populációk képviselik azoknak a limfocitáknak a számát, amelyek a felszínükön PKH-jelzett EV-eket kötöttek. Mind a limfociták anti-PSR antitest előkezelése, mind az embrió-eredetű EV-k exofaciális foszfatidil-szerinjének annexin V-vel történő blokkolása részben gátolta az EV-k kötődését.

4.3.4 Az embrió eredetű EV-k jelenlétében a CD8+ limfociták IL-10 termelése emelkedett

Anti- CD4 vagy anti- CD8 ellenanyaggal jelölt egér lépsejteket embrió-eredetű EV-
kel, ill. 30 percig 37°C on anti- PIBF ellenanyaggal kezelt EV-vel inkubáltunk. Ezután a
lépsejteket anti- IL-10 ellenanyaggal jelöltük, és áramlási citometriával meghatároztuk az
IL-10 pozitív sejtek számát.

Az EV-k jelenléte szignifikánsan fokozta az IL-10+ CD8+ sejtek számát, az EV-k
előzetes anti- PIBF kezelése ezt megakadályozta (18. ábra). Az EV-k nem befolyásolták a
CD4+ és a B- sejtek IL-10 termelését.



18. ábra: Embrió-eredetű, PIBF-tartalmú EV-k hatása a CD8+ lépsejtek IL-10 termelésére.

* $p < 0,001$.

4.4. A tenyésztett embriók által termelt nukleinsav tartalmú EV-k száma jelzi az embrió implantációs képességét

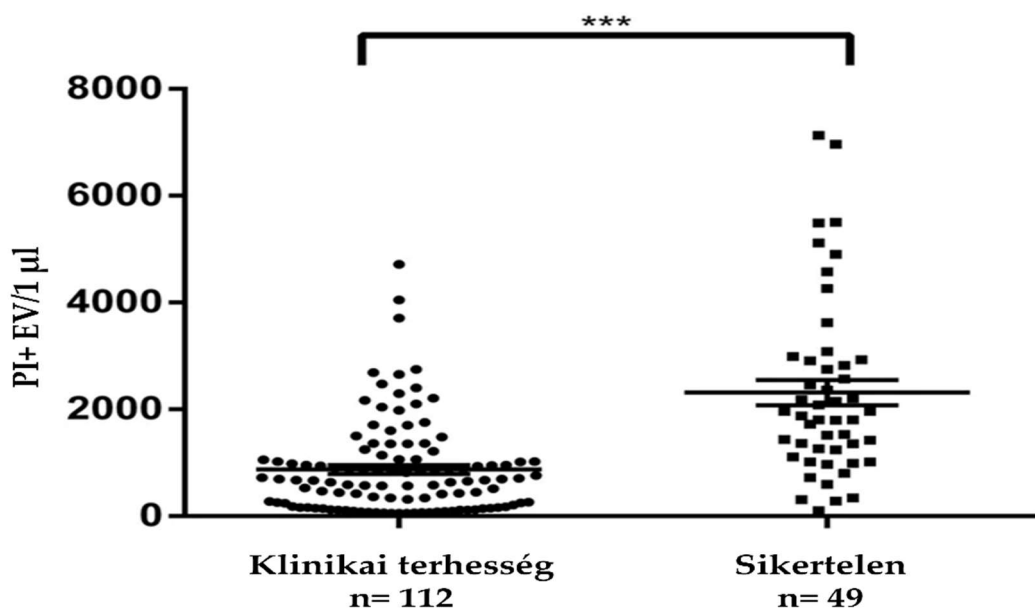
4.4.1. A PI+ EV-k száma szignifikánsan alacsonyabb a kompetens embriók tápfolyadékában, mint azokéban, amelyek nem ágyazódnak be

Nyolcvannyolc, asszisztált reprodukciós kezelésben részesülő infertilis asszony embrióit vizsgáltuk. A legtöbb esetben egynél több embrió beültetése történt.

A kimenetel ismeretében két csoport alakult ki.

- 1) Nem jött létre beágyazódás N=30
- 2) Klinikai terhesség alakult ki N=58

A PI+ EV-k száma szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb volt azon embriók 5. napos tenyésztő folyadékában, amelyek beültetése klinikai terhességet eredményezett (N=112), mint azokéban, amelyek nem ágyazódtak be (N=49) (19. ábra).

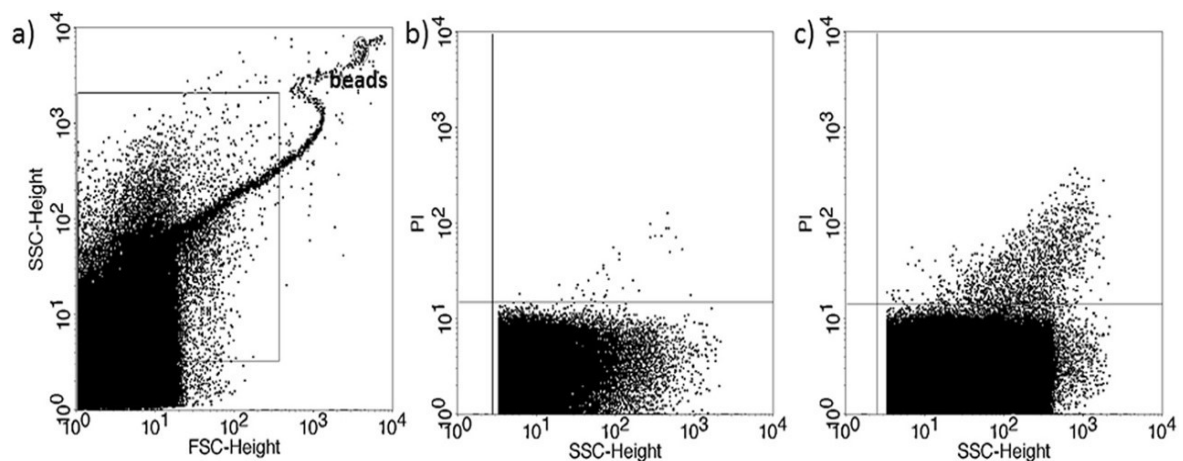


19. ábra: Propidium jodid (PI)+ EV-k a klinikai terhességet eredményező, és a nem implantálódó embriók tenyésztőfolyadékában. *** $p < 0,001$

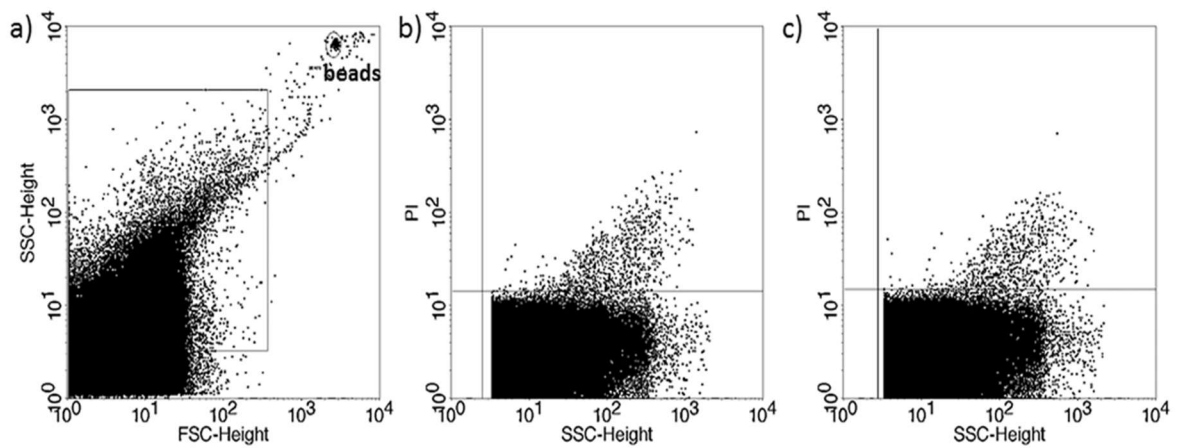
4.4.2. A kompetens embrió azonosítása az 5. napos tenyésztőfolyadék PI+ EV tartalma alapján

Száztizenkét embrió beültetése 58 nőbe 64 implantációt eredményezett. Negyvenöt esetben 2, öt esetben 3, és 8 esetben egy embrió beültetése történt. (egy minta másra lett felhasználva a statisztika nem tartalmazza).

Ha két embrió beültetése egyes terhességet eredményezett, az egyik beültetett embrió tápfolyadékában jelentősen alacsonyabb számú PI+ EV-t mutattunk ki, mint a másikéban (20. ábra), míg, amikor két embrió beültetése után sem jött létre a terhesség, mindkét embrió tápfolyadékában magas volt a PI+ EV-k száma (21. ábra).

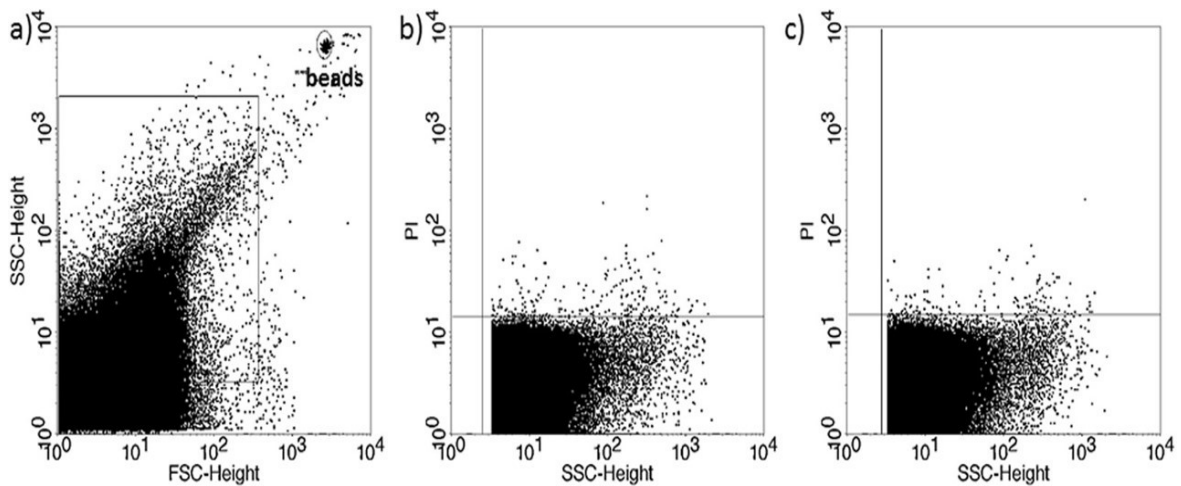


20. ábra: 5. napos embriók tápfolyadékában található PI+ EV-k száma. Két embrió beültetése egyes terhességet eredményezett. a) Reprezentatív dot plot az EV-k méret szerinti eloszlását mutatja. b) és c) dot plotok mutatják az egy anyába ültetett embriók PI+ EV számát.



21. ábra: 5. napos embriók tápfolyadékában található PI+ EV-k száma. Két embrió beültetése nem eredményezett terhességet. a) Reprezentatív dot plot az EV-k méret szerinti eloszlását mutatja. b) és c) dot plotok mutatják az egy anyába ültetett embriók PI+ EV számát.

Két embrió beültetése hat esetben ikerterhességet eredményezett, és mindkét embrió tenyésztő folyadékában alacsony számú PI+ EV-t mutattunk ki (22. ábra).

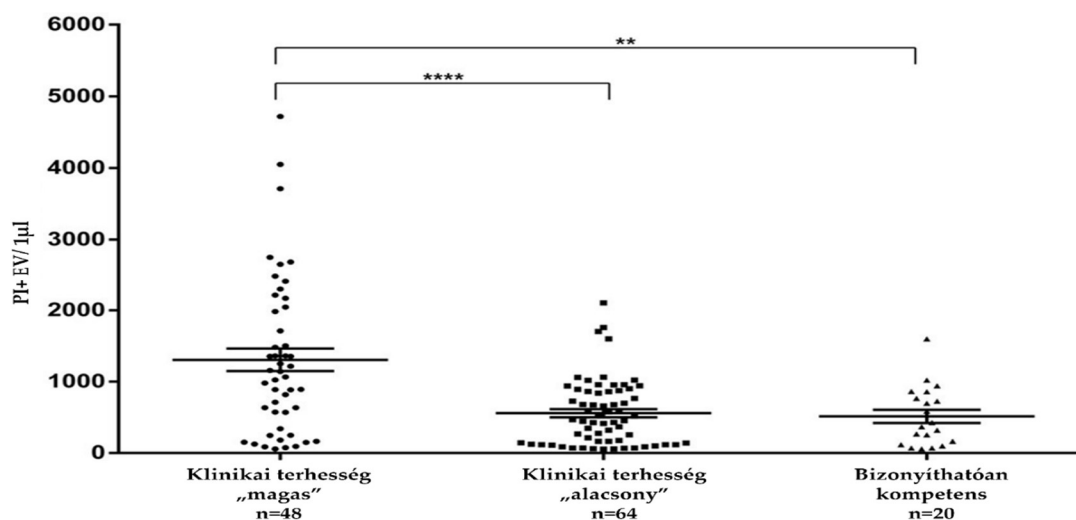


22. ábra: 5. napos embriók tápfolyadékában található PI+ EV-k száma. Két embrió beültetése ikerterhességet eredményezett. a) Reprezentatív dot plot az EV-k méret szerinti eloszlását mutatja. b) és c) dot plotok mutatják az egy anyába ültetett embriók PI+ EV számát.

A klinikai terhességgel végződő csoportban az alacsonyabb számú PI+ EV-t termelő embriók tápfolyadékát a magasabb számú PI+ EV-t termelő embriók tápfolyadékával összehasonlítva szignifikáns ($p < 0,001$) volt a különbség a két csoport között (23. ábra).

Ennek alapján feltételezhető, hogy azok az embriók implantálódtak, amelyek alacsonyabb számú PI+ EV-t termeltek.

Nyolc esetben egyetlen embrió beültetése egyes terhességet, további 6 esetben két embrió beültetése ikerterhességet eredményezett. Ezen embriók PI+ EV termelése tehát egyértelműen összekapcsolható beágyazódási hajlamukkal. Valamennyi ebbe a kategóriába tartozó embrió alacsony számú PI+ EV-t termelt (23. ábra), ami megerősíti a feltételezést, hogy a kompetens embrió azonosítható a termelt alacsony PI+ EV szám alapján. Az adatok egyben arra is utalnak, hogy ha ugyanazon anya tenyésztett embrióinak tápfolyadékai között jelentős különbségek mutatkoznak, a legalacsonyabb számú nukleinsav tartalmú EV-t termelő embrióknak a legnagyobb az esélye a beágyazódásra.



23. ábra: A klinikai terhességgel végződő beültetések embrióinak magas (N=48) vagy alacsony (N=64) számú PI+ EV-t tartalmazó tápfolyadékai. Összehasonlításként feltüntettük a bizonyíthatóan kompetens embriók (N=20) tápfolyadékában mért PI+ EVk számát.

** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

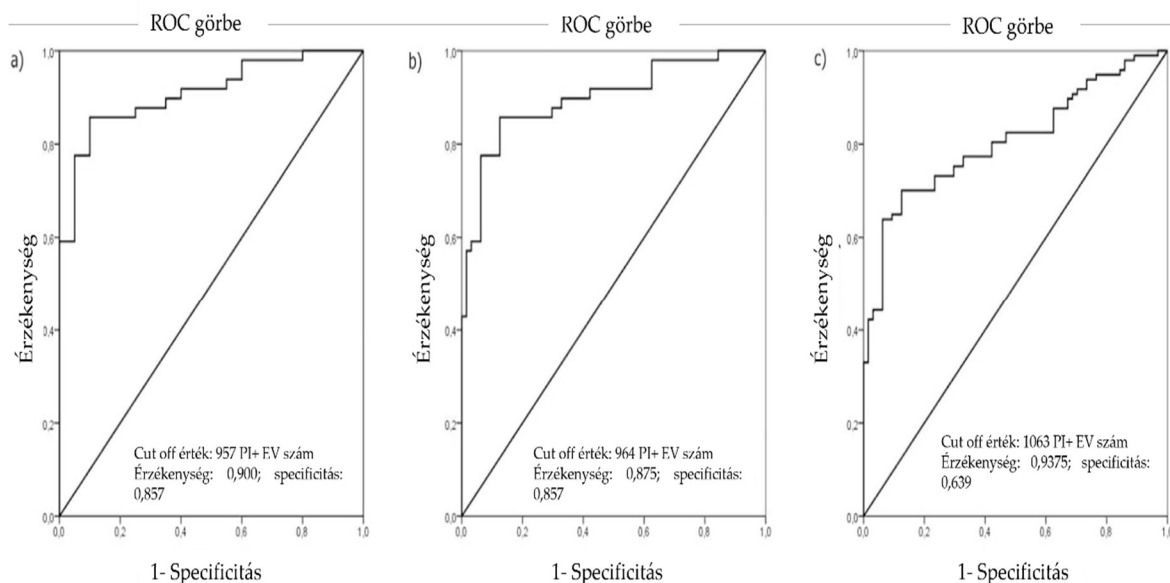
4.4.3. A jó beágyazódási hajlammal rendelkező és a nem implantálódó embriók azonosítása

A különböző adathalmazokat ROC analízissel elemeztük.

A bizonyítottan kompetens embriók, vs. a nem implantálódott embriók által termelt PI+ EV-k számát ROC analízissel vizsgálva (24/a. ábra) a két csoportot elkülönítő cut off szint 957 PI+ EV-nek bizonyult. A kompetens embrió 90% szenzitivitással és 85.7% specificitással azonosítható.

A valószínűsíthetően kompetens embriók (az azonos anyától származó embriók közül a legalacsonyabb PI+ EV számmal rendelkező), és a nem implantálódott embriók által termelt PI+ EV-k számát összehasonlítva (24/b ábra) a cut off érték of 964-nek bizonyult.

A valószínűsíthetően kompetens embriók, és a valószínűsíthetően nem implantálódott embriók által termelt PI+ EV-k számát összehasonlítva (24/c ábra) a cut off érték 1063-nak bizonyult. A módszer szenzitivitása 93.7% specificitása 64%.



24. ábra: ROC analízis az optimális cut-off érték és a módszer diagnosztikai értékének meghatározására. (a) Bizonyítottan kompetens embriók versus (vs.) a nem implantálódott embriók adatai. (b) Feltehetően kompetens embriók (azonos anyától származó embriók közül a legalacsonyabb számú PI+ EV-t termelő) vs. a nem implantálódó embriók adatai. (c) A feltehetően kompetens embriók adatai vs. a feltehetően inkompetens embriók a klinikai terhességgel végződő csoportban, plusz a sikertelen implantáció csoport adatai.

Az eredmények azt mutatják, hogy a tenyésztés során az embrió által a tápfolyadékba kibocsátott PI+ EV-k száma jól elkülöníti a kompetens és az implantálódni nem képes embriót.

A 964 PI+ EV, cut off szintet alkalmazva 64 feltételezetten kompetens embrió közül 8 (12.5%) termelt ennél magasabb, és a 49 nem implantálódott embrió közül 7 (14%) ennél alacsonyabb számú PI+ EV-t.

A 20 biztosan kompetens embrió közül 19 a cut off szint alatti számban termelt PI+ EV-t. Megállapítható tehát, hogy az azonos anyától származó tenyésztett embriók közül a legalacsonyabb számú PI+ EV-t termelő beültetése ajánlott.

5. DISZKUSSZIÓ

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a PIBF elősegíti az endometriális strómasejtek deciduális átalakulását, és az implantációs ablak alatt expresszálódik legerősebben az egér endometriumban [Mulac-Jeričević és mtsai. 2019], ami arra enged következtetni, hogy a PIBF szerepet játszhat az implantáció folyamatában. Ennek tisztázása céljából, a peri-implantációs időszakban specifikus ellenanyaggal neutralizáltuk a PIBF biológiai aktivitását, és vizsgáltuk ennek funkcionális következményeit.

A funkcionálisan PIBF hiányos egerekben az implantációs helyek száma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll egerekben, és azok az embriók, amelyek a PIBF hiányában is beágyazódtak, a későbbiekben fokozott mértékben pusztultak el. Korábbi megfigyelések szerint a terhesség 8,5. napján történt anti- PIBF kezelés a kontroll 8%-hoz képest 40%-ra emelte a rezorbeálódott magzatok arányát [Szekeres-Barthó és mtsai. 1997], a jelen adatok pedig azt mutatják, hogy a peri-implantációs időszakban kialakult PIBF hiány ezen felül a beágyazódást is gátolja.

A PIBF termelésére számos sejt ill. szövet, így a keringő limfociták [Szekeres-Barthó és mtsai. 1995], maga az embrió, a trofoblaszt [Anderle és mtsai. 2008b] és az endometriális sejtek [Mulac-Jeričević és mtsai. 2019] képes. A sikeres IVF kezelésben részesült nők szérumában a PIBF 14 nappal az embriótranszfer után kimutatható [Hudic és mtsai, 2020]. Bár már a tenyésztett embrió is termel PIBF-t, egyetlen embrió természetesen nem képes olyan mennyiségű fehérje termelésére, amely a szérumban mérhető koncentrációkat eredményezne, valószínűbb, hogy az embrió jelenlétét felismerő anyai oldal felelős a szérumban is megjelenő PIBF termeléséért.

A továbbiakban megvizsgáltuk milyen folyamatok állhatnak a PIBF hiány okozta beágyazódási zavar hátterében.

A sikertelen terhességek egy részében jellemzően magas az anyai NK aktivitás [de Fougerolles és mtsai. 1987; Kinsky és mtsai. 1990; Aoki és mtsai. 1995; Fukui és mtsai. 1999; Ntrivalas és mtsai. 2001, 2005; Yamada és mtsai, 2001; Putowski és mtsai. 2004; Shakhar és mtsai. 2003]. A progeszteron és a PIBF terhességre kifejtett kedvező hatása részben az NK aktivitás szabályozásán keresztül valósul meg. A progeszteron koncentrációfüggő módon csökkenti a terhes nők keringő NK sejtjeinek aktivitását [Szekeres-Barthó, és mtsai. 1985], és terhes egerek progeszteron receptorainak blokkolása szignifikánsan növeli az NK aktivitást [Hansen és mtsai. 1992].

A deciduális limfociták 60-70%-át mind emberben, mind egérben az NK sejtek teszik ki [King és mtsai. 1991; Croy és mtsai. 1993] Ezek a sejtek fenotípusosan és funkcionálisan is különböznek a perifériás vérben található NK sejtektől [López-Botet és mtsai. 1996; Cooper és mtsai. 2001; Koopman és mtsai. 2003; Trundley és mtsai. 2004]. A humán perifériás NK sejtek túlnyomó része kis mértékben fejezi ki az CD56 (CD56^{dim}) és nagy mértékben a FC γ RIII (CD16) antigéneket, ezzel szemben, a deciduális NK sejteket a CD56 molekula erős expresszója jellemzi, és hiányzik a CD16. Ennél is lényegesebb különbség, hogy míg a keringő NK sejtek legfontosabb tulajdonsága citotoxikus aktivitásuk, a deciduában található NK sejtek annak ellenére, hogy a citoplazmatikus granulumaikban jelen levő perforin és granzim [Koopman és mtsai. 2003], képessé tenné őket lítikus aktivitásra, nem citotoxikusak [Rukavina és mtsai. 1995; Cooper és mtsai. 2001; Crncic és mtsai. 2007]. Ehelyett nagy mennyiségben citokineket és angiogén faktorokat termelnek [Koopman és mtsai. 2003]. Megjelenésük dinamikája alapján ezek a sejtek a placenta kialakulásában és fejlődésében játszhatnak szerepet.

A deciduális NK sejtek alacsony citotoxikus aktivitása azért meglepő, mert keringő társaikhoz hasonlóan citoplazmatikus granulumaikban perforint, granzim A-t és B-t tartalmaznak [Koopman és mtsai. 2003; Crncic és mtsai. 2005], tehát rendelkeznek az öléshez szükséges fegyvertárral [King és mtsai. 1993; Rukavina és mtsai. 1995; Quillay és mtsai. 2016]. Bár bizonyos körülmények között, pl. spontán vetélés alkalmával, ezek a sejtek képesek degranulálódni, normális lefolyású terhességben nem citotoxikusak, aminek egyik oka lehet, hogy a PIBF gátolja citotoxikus molekulák felszabadulását a dNK sejtek granulumaiból [Faust és mtsai. 1999].

A deciduális NK sejtek granulumaikban a citotoxikus enzimek mellett PIBF-t is tartalmaznak, mely részben magyarázatot ad alacsony citotoxikus aktivitásukra [Bogdán és mtsai. 2017], és a PIBF gátolja az aktivált deciduális limfocitákban a perforin expresszió fokozódását, továbbá a citoplazmatikus granulumok kiürülésének gátlása útján pedig csökkenti a lítikus aktivitást [Faust és mtsai. 1999; Laškarin és mtsai. 1999] Bogdán és mtsai. nagyszámú PIBF+ NK sejtet mutattak ki 12.5 napos terhes egerek deciduáiban [Bogdán és mtsai. 2017]. A peri-implantációs időszakban PIBF hiányossá tett egerek deciduájában a kontrollokhöz viszonyítva jelentősen csökkent a PIBF+ NK sejtek száma, és ezzel párhuzamosan fokozódott mind a perifériás, mind a deciduális NK sejtek lítikus aktivitása.

Az NK aktivitás és a terhesség kimenetele közti összefüggés ismert. Középidős terhes egerek anti- PIBF kezelése fokozza az NK aktivitást és a rezorpció arányt. Az anti- PIBF kezelt egerek anti- NK ellenanyagokkal történő egyidejű kezelése megakadályozza a magas rezorpció arány kialakulását, ami arra utal, hogy a PIBF egérben az NK aktivitás gátlása révén védi a terhességet [Szekeres-Barthó és mtsai. 1997], tehát a peri-implantációs

időszakban PIBF hiányos egerek PIBF+ decíduális NK sejtjeinek hiánya következtében megnőtt decíduális NK aktivitás lehet a fokozott magzati veszteség hátterében.

A B- sejtek a decíduális limfociták töredékét képviselik, ennek ellenére fontos szerepet játszanak a lokális immunológiai egyensúly kialakításában. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint a PIBF1 tartalmú decíduális B- sejtek mind egérben, mind emberben védelmet nyújtanak az idő előtti terhességmegszakadással szemben [Huang és mtsai. 2017]. A PIBF deficiens egerek decíduájából hiányoznak a 12,5 napos kontroll terhes egerekben a chorio-decíduális határon megfigyelhető B- sejtek, , következésképpen a már beágyazódott embriók későbbi sorsa is kétséges.

Végül megvizsgáltuk, hogy a PIBF hiánya befolyásolja-e a T- sejt aktiválódásban és differenciálódásban szerepet játszó genek expresszióját. A T- sejt receptort az alfa és béta lánc, valamint a CD3 alkotja. A T- sejt aktivációban nem csupán az MHC-vel együtt bemutatott immunogén peptid, de a T- sejt, valamint az antigén prezentáló sejt (APC) által kifejezett ko-stimulátor molekulák is részt vesznek. Ko-stimuláció hiánya T- sejt receptor jelátvitel anergiát eredményez.

A T- sejt differenciálódás szabályozásában a T- sejt receptor mellett számos az APC-n található ligandjával kapcsolódó sejt felszíni receptor is közrejátszik. A CD4 kapcsolódik az MHC II molekulával és stabilizálja a T- sejt és az APC interakcióját [Leitenberg és mtsai. 1998; Krummel és mtsai. 2000]. CD28 a T- sejten kifejeződő ko-stimulátor, amely az aktivált APC által expresszált CD80 és CD86 molekulákat köti [Lanier és mtsai. 1995]. A T- sejt aktiválódáshoz vezető első szignált a sejt receptor / CD3 komplex, a második jelet pedig a CD28 kötése biztosítja. Mindkét jel szükséges az IL-2 termeléshez és a T- sejt proliferációhoz.

A PIBF hiányos egerek CD4⁺ T- sejtjein a T- sejt receptor komplex tagjait kódoló gének csökkent mértékben expresszálódtak, míg a CD8⁺ sejteken fokozott CD3D és IL2RB, valamint G expresszió volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy ezekben az állatokban gátolt a T helper sejtek aktiválódása.

A hízósejtek, bazofil és eozinofil granulociták, továbbá NK sejtek és aktivált CD4⁺ T- sejtek által termelt IL-4 a Th2 irányú differenciálódást segíti elő [Rautajoki és mtsai. 2008]. A PIBF hiányos egerek CD4⁺ sejtjeiben az IL-4 gén szignifikánsan down-regulálódott, míg a CD8⁺ sejtekben fokozódott az IL-12A expressziója.

A fentiekből látható, hogy PIBF hiányában az anyai immunválasz a terhesség fennmaradása szempontjából kedvezőtlen módon változik meg. PIBF hiányos egerek NK aktivitása fokozódik, a CD4⁺ T- sejteken csökken a T- sejt aktiválásban szerepet játszó gének expressziója, így azok a T- sejtek, melyek a normális lefolyású terhességre jellemző Th2 domináns citokin egyensúly kialakításában szerepet játszanak, működésképtelenné válnak. Fokozza a problémát, hogy a naiv T- sejtek PIBF hiányában Th1 irányban differenciálódnak, ami kedvezőtlen a magzati antigéneket toleráló immunológiai környezet kialakítása szempontjából. Ezen immunológiai változásokkal párhuzamosan csökken az implantációs arány, és nő a magzati veszteség.

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a PIBF jelenléte szükséges a terhesség normális lefolyása szempontjából kulcsfontosságú Th2 domináns citokin egyensúly kialakulásához [Dey és mtsai. 2004].

Felmerül ezek után a kérdés, hogy az implantáció időszakában hogyan kommunikál az embrió az anyai immunrendszerrel. Az EV-k lipid membránnal határolt struktúrák, melyekbe a kibocsátó sejt nukleinsavakat, fehérjéket vagy egyéb molekulákat csomagol.

Ezek az üzenetek eljutnak a környező sejtekhez, így az extracelluláris vezikulák a sejtek közötti párbeszéd eszközeiként működnek. Az embrió által termelt extracelluláris vezikulák kimutathatók a tenyésztett embriók tápfolyadékában, valamint elektronmikroszkóppal, az implantáció helyén, az endometrium és a beágyazódó embrió közti résben. Immunfestéssel igazolható, hogy az embrió által termelt extracelluláris vezikulák egyebek közt PIBF-t is tartalmaznak.

Egerek perifériás limfocitái embrió-eredetű extracelluláris vezikulák jelenlétében fokozott mértékben termelik az IL-10 citokint, tehát az embrió eredetű extracelluláris vezikulák befolyásolják az anyai immunrendszer működését, hozzájárulva a magzat intrauterin fejlődése szempontjából kedvező immunológiai környezet megteremtéséhez [Pawar és mtsai. 2014].

Az implantáció sikerének másik tényezője a jó minőségű embrió. Több országban elterjedt eljárás az asszisztált reprodukció során, egynél több embrió beültetése. Ez a gyakorlat azonban nem csupán a terhesség esélyét, de az ikerterhesség veszélyét is növeli. Az ikerterhesség a koraszülés leggyakoribb oka. Míg az egyes terhességek 12-15%-a, az ikerterhességek 50%-a végződik koraszüléssel [Murray és mtsai. 2018]. Nem beszélve az esetleges későbbi következményekről, a koraszülött csecsemő perinatális ellátásával kapcsolatos költségek tízszer magasabbak, mint a terminusra született egészséges újszülötteké. A fentiek miatt a követendő eljárás egyetlen embrió beültetése lenne, ehhez azonban képesnek kell lennünk azonosítani azt az embriót, amely képes lesz beágyazódni a receptív endometriumba.

Kidolgoztunk egy nem invazív, egyszerűen és gyorsan elvégezhető módszert, amely alkalmas arra, hogy a tenyésztett embriók 5. napos tápfolyadékában található nukleinsav tartalmú (PI+) tartalmú extracelluláris vezikulák számának meghatározásával kiválasszuk

azt az embriót, melynek legnagyobb az esélye a beágyazódásra. A vizsgálatba 88 IVF kezelésben részesült nőt választottunk be. Ötvennyolc esetben klinikai terhesség jött létre, harminc esetben sikertelen volt a beültetés. A klinikai terhességet eredményező 112 embrió tápfolyadékában szignifikánsan alacsonyabb volt a nukleinsav tartalmú EV-k száma, mint annak a 49 embriónak a tápfolyadékában, melyek nem implantálódtak. Tekintve, hogy a hazai gyakorlatnak megfelelően legtöbb esetben egynél több embrió került beültetésre, feltételeztük, hogy a beültetett két embrió közül az implantálódott, amelynek tápfolyadékában alacsonyabb volt a PI+ extracelluláris vezikulák száma. Ennek a feltételezésnek bizonyítására húsz olyan embrió tápfolyadékát vizsgáltuk, amelyeknek egyes beültetése egy klinikai terhességet eredményezett, így azonosítható volt az összefüggés a beágyazódott embrió és a tenyésztőfolyadékában található PI+ EV-k száma között. A vizsgált húsz tápfolyadék közül 19-ben alacsony volt a nukleinsav tartalmú EV-k száma, ami azt mutatja, hogy ez a módszer valóban alkalmas a jó beágyazódási képességgel rendelkező embrió azonosítására.

A módszer előnye, hogy gyorsan elvégezhető így közvetlenül a friss embrió transzfer előtt kiválasztható az az embrió, amelynek a legnagyobb az esélye a beágyazódásra.

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a PIBF nélkülözhetetlen a receptív endometrium kialakulásához, az embrió extracelluláris vezikulák segítségével kommunikál az anyai immunrendszerrel, az embrió által termelt nukleinsav tartalmú extracelluláris vezikulák számának meghatározása alkalmas a legjobb implantációs készséggel rendelkező embrió kiválasztására.

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A PIBF szerepe az implantációban:

- A preimplantációs egér embrióban jelen vannak az implantáció sikerességével kapcsolatba hozható molekulák. Az embrió erősen expresszál PIBF-t.
- Az anyai PIBF szint jelentős csökkenése az implantációs ablak alatt beágyazódási zavarhoz vezet. Ennek hátterében a következők állnak:
 - PIBF hiányában az anyai szervezetben, mind a perifériás, mind a decíduális NK- sejtek citotoxicitása megnő.
 - A PIBF semlegesítése a korio-decíduális rétegből eltünteti a B- limfocitákat, melyeknek fontos szerepe van a terhesség fenntartásában.
 - A peri-implantációs időszakban PIBF hiányos egerek CD4+ T- sejtjein az aktivációhoz szükséges gének csökkent mértékben expresszálódnak, és a T- sejtek Th1 irányban differenciálódnak.
- Az anya és az embrió közötti kommunikáció részben extracelluláris vezikulák útján történik.
- Az embrió által kibocsátott annexin V jelölt EV-k flow citometriával kimutathatók.
- Az embrió- eredetű extracelluláris vezikulák PIBF-t tartalmaznak.
- Az embrió eredetű extracelluláris vezikulák foszfatidil- szerin foszfatidil- szerin receptor kölcsönhatás révén kötődnek a CD4+ és CD8+ sejtekhez.
- Az egér limfociták embrió eredetű PIBF tartalmú EV-k jelenlétében fokozottan termelnek IL-10 citokint, ami alátámasztja, hogy az embrió által kibocsátott EV-knek szerepük van a terhesség során kialakuló Th2 irányú immunológiai miliő kialakításában.

A PIBF-nek nem csupán a terhesség fenntartásában, de az implantációban is hatalmas szerepe van. A terhesség normál lefolyásához elengedhetetlen toleráns immunológiai környezet kialakításához, EV-k általi kommunikációval maga az embrió is hozzájárul már a megtermékenyítéstől kezdve.

A kompetens embrió azonosítása:

- Az embriók nukleinsav tartalmú EV-eket bocsátanak ki a tenyésztőfolyadékukba in vitro tenyésztés során.
- Ezek a nukleinsav tartalmú EV-k PI jelöléssel és flow citometriával mérhetők.
- Az embriók által kibocsátott PI+ EV-k száma és implantációs kapacitásuk között fordított arányosság áll fenn.

Az általunk kidolgozott módszer a jövőben egy gyors diagnosztikai lehetőséget biztosíthat a kompetens embrió azonosítására.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok mindenkinek, aki hozzásegített PhD. dolgozatom elkészüléséhez. Először is témavezetőmnek és mentoromnak Szekeres Júlia professzor asszonynak tartozom köszönettel, a szakmai vezetéséért, türelméért. Köszönöm, a rengeteg tanulási lehetőséget, amit az évek alatt biztosított számomra, valamint a kutatásaimhoz szükséges anyagi források előteremtését. Szívből köszönöm Dr. Bognár Zoltán Főorvos Úrnak, útmutatásait, ötleteit és szakmai segítségét, valamint a rengeteg szakmai tapasztalatot, amit az évek során volt szerencsém elsajátítani tőle. Köszönettel tartozom Dr. Pállinger Évának és csapatának a SOTE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetből, a kísérletekben való együttműködésért. Köszönöm Gödöny Krisztinának és a pécsi Nemzeti Reprodukciós Módszertani Kutatóközpont munkatársainak, hogy a humán embrió tápfolyadék mintákat a rendelkezésünkre bocsátották. Köszönöm Görgey Éva kolléganőmnek, hogy az évek során igazi csapatként sikerült együtt dolgoznunk. Köszönöm volt asszisztensünknek Molnár Évának, hogy segített a labormunka alapjait elsajátítani. Köszönöm jelenlegi asszisztenseinknek Pejtsik Juditnak és Gáspár Gábornak, hogy valódi csapatként segítik mindennapi munkámat és rengeteg terhet levesznek a vállamról. Hálás köszönettel tartozom az Orvosi Biológiai Intézet minden dolgozójának, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk szakmai segítségért, ötletekért. Köszönöm Dr. Berta Gergelynek és Dr. Sétáló Györgynek a konfokális mikroszkóp használatához nyújtott segítségüket. Köszönettel tartozom régi intézetünk az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet munkatársainak, ahol a kutatásaimat kezdtem. Végül hálás szívvel köszönöm szüleimnek, Csabai Editnek és Csabai Attilának, hogy erejükön felül mindent megadtak számomra, bíztattak és végig hittek bennem, valamint, köszönöm férjemnek, Tanics Krisztiánnak, hogy végig szeretettel biztatott és támogatott céljaim megvalósításában.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Anderle, C., Hammer, A., Polgár, B., Hartmann, M., Wintersteiger, R., Blaschitz, A., Dohr, G., Desoye, G., Szekeres-Barthó, J., & Sedlmayr, P. (2008a). Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *Journal of Reproductive Immunology*, 79(1), 26–36. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2008.06.002>

Anderle, C., Hammer, A., Polgár, B., Hartmann, M., Wintersteiger, R., Blaschitz, A., Dohr, G., Desoye, G., Szekeres-Barthó, J., & Sedlmayr, P. (2008b). Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *Journal of Reproductive Immunology*, 79(1), 26–36. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2008.06.002>

Aoki, K., Kajiuira, S., Matsumoto, Y., Ogasawara, M., Okada, S., Yagami, Y., & Gleicher, N. (1995). Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet (London, England)*, 345(8961), 1340–1342. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92539-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92539-2)

Arcuri, F., Ricci, C., Ietta, F., Cintonino, M., Tripodi, S. A., Cetin, I., Garzia, E., Schatz, F., Klemi, P., Santopietro, R., & Paulesu, L. (2001). Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1200–1205. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD64.4.1200>

Ashkar, A. A., Di Santo, J. P., & Croy, B. A. (2000). Interferon γ Contributes to Initiation of Uterine Vascular Modification, Decidual Integrity, and Uterine Natural Killer Cell Maturation during Normal Murine Pregnancy. *Journal of*

Experimental Medicine, 192(2), 259–270.
<https://doi.org/10.1084/JEM.192.2.259>

Balassa, T., Berta, G., Jakab, L., Bohonyi, N., & Szekeres-Bartho, J. (2018). The effect of the Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) on E-cadherin expression, cell motility and invasion of primary tumour cell lines. *Journal of Reproductive Immunology*, 125, 8–15.
<https://doi.org/10.1016/J.JRI.2017.10.047>

Bergman, D., Halje, M., Nordin, M., & Engström, W. (2013). Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A Mini-Review. *Gerontology*, 59(3), 240–249. <https://doi.org/10.1159/000343995>

Bogdan, A., Berta, G., & Szekeres-Bartho, J. (2017). PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *Journal of Reproductive Immunology*, 119, 38–43.
<https://doi.org/10.1016/J.JRI.2016.12.001>

Burnett, L. A., Light, M. M., Mehrotra, P., & Nowak, R. A. (2012). Stimulation of GPR30 Increases Release of EMMPRIN-Containing Microvesicles in Human Uterine Epithelial Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(12), 4613. <https://doi.org/10.1210/JC.2012-2098>

Catalán, D., Mansilla, M. A., Ferrier, A., Soto, L., Oleinika, K., Aguillón, J. C., & Aravena, O. (2021). Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Frontiers in Immunology*, 12, 611795.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.611795/BIBTEX>

Chaouat, G., Menu, E., Kinsky, R., Dy, M., Minkowski, M., Delage, G., Thang, M. N., Clark, D. A., Wegmann, T. G., & Szekeres-Bartho, J. (1990). Lymphokines and non specific cellular lytic effectors at the fetomaternal interface affect

placental size and survival. *Reproductive Immunology 1989. Proceedings of the 4th International Congress on Reproductive Immunology, Kiel, Germany, 26-29 July 1988.*, 283–289.

- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., & Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, 3(4), 339–345. <https://doi.org/10.1038/35070009>
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11), 633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
- Crncic, T. B., Laskarin, G., Frankovic, K. J., Tokmadzic, V. S., Strbo, N., Bedenicki, I., Le Bouteiller, P., Tabiasco, J., & Rukavina, D. (2007). Early pregnancy decidual lymphocytes beside perforin use Fas ligand (FasL) mediated cytotoxicity. *Journal of Reproductive Immunology*, 73(2), 108–117. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2006.07.001>
- Crncic, T. B., Laskarin, G., Juretic, K., Strbo, N., Dupor, J., Srsen, S., Randic, L., Le Bouteiller, P., Tabiasco, J., & Rukavina, D. (2005). Perforin and Fas/FasL Cytolytic Pathways at the Maternal–Fetal Interface. *American Journal of Reproductive Immunology*, 54(5), 241–248. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2005.00320.X>
- Croy, B. A., & Kiso, Y. (1993). Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Microscopy Research and Technique*, 25(3), 189–200. <https://doi.org/10.1002/JEMT.1070250302>

- de Fougérolles, A. R., & Baines, M. G. (1987). Modulation of the natural killer cell activity in pregnant mice alters the spontaneous abortion rate. *Journal of Reproductive Immunology*, *11*(2), 147–153. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(87\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0165-0378(87)90018-0)
- Demir, R., Seval, Y., & Huppertz, B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochemica*, *109*(4), 257–265. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2007.02.008>
- Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., & Wang, H. (2004). Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, *25*(3), 341–373. <https://doi.org/10.1210/ER.2003-0020>
- Esteve-Solé, A., Luo, Y., Vlasea, A., Deyà-Martínez, Á., Yagüe, J., Plaza-Martín, A. M., Juan, M., & Alsina, L. (2018). B Regulatory Cells: Players in Pregnancy and Early Life. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS19072099>
- Faust, Zs., Laškarin, G., & Rukavina, D. (1999). Progesterone-Induced Blocking Factor Inhibits Degranulation of Natural Killer Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, *42*(2), 71–75. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1999.TB00468.X>
- Fernandez-Valdivia, R., Mukherjee, A., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O. M., DeMayo, F. J., Amato, P., & Lydon, J. P. (2005). Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: insights from the mouse. *Seminars in Reproductive Medicine*, *23*(1), 22–37. <https://doi.org/10.1055/S-2005-864031>

- Frenette, G., Thabet, M., & Sullivan, R. (2006). Polyol pathway in human epididymis and semen. *Journal of Andrology*, 27(2), 233–239. <https://doi.org/10.2164/JANDROL.05108>
- Fukui, K., Yoshimoto, I., Matsubara, K., Hori, R., Ochi, H., & Ito, M. (1999). Leukocyte function-associated antigen-1 expression on decidual natural killer cells in patients with early pregnancy loss. *Molecular Human Reproduction*, 5(11), 1083–1088. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/5.11.1083>
- Gercel-Taylor, C., O'Connor, S. M., Lam, G. K., & Taylor, D. D. (2002). Shed membrane fragment modulation of CD3-zeta during pregnancy: link with induction of apoptosis. *Journal of Reproductive Immunology*, 56(1–2), 29–44. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(02\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(02)00025-6)
- Guo, X., Yi, H., Li, T. C., Wang, Y., Wang, H., & Chen, X. (2021). Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Embryo Implantation: Clinical Implications. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 253, 11(2), 253. <https://doi.org/10.3390/BIOM11020253>
- Gutiérrez-Rodríguez, A., & Camacho-Arroyo, I. (2016). PAPEL DEL FACTOR DE BLOQUEO INDUCIDO POR PROGESTERONA (PIBF) EN EMBARAZO Y CÁNCER. *TIP*, 19(2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/J.RECQB.2016.06.004>
- Guzman-Genuino, R. M., Dimova, T., You, Y., Aldo, P., Hayball, J. D., Mor, G., & Diener, K. R. (2019). Trophoblasts promote induction of a regulatory phenotype in B cells that can protect against detrimental T cell-mediated inflammation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 82(6), e13187. <https://doi.org/10.1111/AJI.13187>

- György, B., Módos, K., Pállinger, É., Pálóczi, K., Pásztói, M., Misják, P., Deli, M. A., Sipos, Á., Szalai, A., Voszka, I., Polgár, A., Tóth, K., Csete, M., Nagy, G., Gay, S., Falus, A., Kittel, Á., & Buzás, E. I. (2011). Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, *117*(4), e39–e48. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-09-307595>
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* *2011* *68:16*, *68*(16), 2667–2688. <https://doi.org/10.1007/S00018-011-0689-3>
- Halasz, M., Polgar, B., Berta, G., Czimbalek, L., & Szekeres-Bartho, J. (2013). Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *70*(23), 4617–4630. <https://doi.org/10.1007/S00018-013-1404-3>
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T. I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., & Mandelboim, O. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine*, *12*(9), 1065–1074. <https://doi.org/10.1038/NM1452>
- Hansen, K. A., Opsahl, M. S., Nieman, L. K., Baker, J. R., & Klein, T. A. (1992). Natural killer cell activity from pregnant subjects is modulated by RU 486. *American*

Journal of Obstetrics and Gynecology, 166(1 Pt 1), 87–90.
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(92\)91835-X](https://doi.org/10.1016/0002-9378(92)91835-X)

Huang, B., Faucette, A. N., Pawlitz, M. D., Pei, B., Goyert, J. W., Zhou, J. Z., El-Hage, N. G., Deng, J., Lin, J., Yao, F., Dewar, R. S., Jassal, J. S., Sandberg, M. L., Dai, J., Cols, M., Shen, C., Polin, L. A., Nichols, R. A., Jones, T. B., ... Chen, K. (2017). Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nature Medicine*, 23(1), 128–135.
<https://doi.org/10.1038/NM.4244>

Hudic, I., Szekeres-Bartho, J., Vrtacnik, E. B., Klun, I. V., Brkic, S., Frangez, H. B., Jancar, N., Mesalic, L., Bogdan, A., & Hudic, L. D. (2020). Progesterone induced blocking factor (PIBF) taken in early pregnancy predicts the pregnancy outcome in women undergoing in vitro fertilization procedure. *Journal of Reproductive Immunology*, 140. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2020.103150>

Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L., & Mathivanan, S. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 688–692.
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.09.019>

Kim, K., Lee, K., & Rhee, K. (2012). CEP90 Is Required for the Assembly and Centrosomal Accumulation of Centriolar Satellites, Which Is Essential for Primary Cilia Formation. *PLoS ONE*, 7(10), 48196.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048196>

- Kim, K., & Rhee, K. (2011). The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *Journal of Cell Science*, *124*(3), 338–347. <https://doi.org/10.1242/JCS.078329>
- King, A., & Loke, Y. W. (1991). On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunology Today*, *12*(12), 432–435. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90014-K](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90014-K)
- King, A., Wooding, P., Gardner, L., & Loke, Y. W. (1993). Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *8*(12), 2061–2067. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A137982>
- KINSKY, R., DELAGE, G., ROSIN, N., THANG, M. N., HOFFMANN, M., & CHAOUAT, G. (1990). A Murine Model of NK Cell Mediated Resorption. *American Journal of Reproductive Immunology*, *23*(3), 73–77. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1990.TB00675.X>
- Koopman, L. A., Kopcow, H. D., Rybalov, B., Boyson, J. E., Orange, J. S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C. J., Schachter, A. D., Park, P. J., & Strominger, J. L. (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *The Journal of Experimental Medicine*, *198*(8), 1201–1212. <https://doi.org/10.1084/JEM.20030305>
- Kozma, N., Halasz, M., Palkovics, T., & Szekeres-Bartho, J. (2006). The progesterone-induced blocking factor modulates the balance of PKC and intracellular Ca. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *55*(2), 122–129. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2005.00337.X>

- Kozma, N., Halasz, M., Polgar, B., Poehlmann, T. G., Markert, U. R., Palkovics, T., Keszei, M., Par, G., Kiss, K., Szeberenyi, J., Grama, L., & Szekeres-Bartho, J. (2006). Progesterone-Induced Blocking Factor Activates STAT6 via Binding to a Novel IL-4 Receptor. *The Journal of Immunology*, *176*(2), 819–826. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.2.819>
- Krummel, M. F., Sjaastad, M. D., Wulfig, C. W., & Davis, M. M. (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science (New York, N.Y.)*, *289*(5483), 1349–1352. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.289.5483.1349>
- Lachmann, M., Gelbmann, D., Kálmán, E., Polgár, B., Buschle, M., Von Gabain, A., Szekeres-Barthó, J., & Nagy, E. (2004). PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *International Journal of Cancer*, *112*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1002/IJC.20326>
- Lanier, L. L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J. H., Linsley, P. S., Okumura, K., Ito, D., & Azuma, M. (1995a). CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *The Journal of Immunology*, *154*(1), 97–105. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.154.1.97>
- Lanier, L. L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J. H., Linsley, P. S., Okumura, K., Ito, D., & Azuma, M. (1995b). CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *154*(1), 97–105.

- Laškarić, G., Faust, Z., Štrbo, N., Sotošek, V., Szekeres-Bartho, J., Podack, E. R., & Rukavina, D. (1999). Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *42*(5), 312–320. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1999.TB00107.X>
- Lédée-Bataille, N., Dubanchet, S., Coulomb-L'hermine, A., Durand-Gasselín, I., Frydman, R., & Chaouat, G. (2004). A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, *81*(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2003.06.007>
- Leitenberg, D., Boutin, Y., Constant, S., & Bottomly, K. (1998). CD4 Regulation of TCR Signaling and T Cell Differentiation Following Stimulation with Peptides of Different Affinities for the TCR. *The Journal of Immunology*, *161*(3), 1194–1203. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.161.3.1194>
- López-Botet, M., Moretta, L., & Strominger, J. (1996). NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules. *Immunology Today*, *17*(5), 212–214. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(96\)30009-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(96)30009-1)
- Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E., & Simpson, R. J. (2012). ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research*, *40*(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR828>
- Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nature Reviews. Immunology*, *2*(9), 656–663. <https://doi.org/10.1038/NRI886>
- Mulac-Jeričević, B., Šučurović, S., Gulic, T., & Szekeres-Bartho, J. (2019). The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the

mouse endometrium. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 81(5). <https://doi.org/10.1111/AJL.13104>

Ng, S. C., Gilman-Sachs, A., Thaker, P., Beaman, K. D., Beer, A. E., & Kwak-Kim, J. (2002). Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 48(2), 77–86. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0897.2002.01105.X>

Ng, Y. H., Rome, S., Jalabert, A., Forterre, A., Singh, H., Hincks, C. L., & Salamonsen, L. A. (2013). Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. *PLOS ONE*, 8(3), e58502. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0058502>

Ntrivalas, E. I., Bowser, C. R., Kwak-Kim, J., Beaman, K. D., & Gilman-Sachs, A. (2005). Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 53(5), 215–221. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2005.00268.X>

Ntrivalas, E. I., Kwak-Kim, J. Y. H., Gilman-Sachs, A., Chung-Bang, H., Ng, S. C., Beaman, K. D., Mantouvalos, H. P., & Beer, A. E. (2001). Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(5), 855–861. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/16.5.855>

- Oh, J. S., Han, C., & Cho, C. (2009). ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Molecules and Cells*, 28(5), 441–446. <https://doi.org/10.1007/S10059-009-0140-X/METRICS>
- Osteikoetxea, X., Sódar, B., Németh, A., Szabó-Taylor, K., Pálóczi, K., Vukman, K. V., Tamási, V., Balogh, A., Kittel, Á., Pállinger, É., & Buzás, I. (2015). Organic & Biomolecular Chemistry Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations †. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13, 9775. <https://doi.org/10.1039/c5ob01451d>
- Pallinger, E., Kiss, A., Pap E, Tóth, S., & Falus, A. (2012). BeWo-derived microvesicles modulate T cell differentiation by the downregulation of IL-6Ralpha expression on CD4 + T lymphocytes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3402/jev.v1i0.18182>
- Pap, E., Pállinger, É., Falus, A., Kiss, A. A., Kittel, Á., Kovács, P., & Buzás, E. I. (2008). T Lymphocytes are Targets for Platelet- and Trophoblast-Derived Microvesicles During Pregnancy. *Placenta*, 29(9), 826–832. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2008.06.006>
- Parant, M. (1990). Possible mediators in endotoxin-induced abortion. *Research in Immunology*, 141(2), 164–168. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(90\)90137-N](https://doi.org/10.1016/0923-2494(90)90137-N)
- Pawar, S., Hantak, A. M., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2014). Minireview: Steroid-Regulated Paracrine Mechanisms Controlling Implantation. *Molecular Endocrinology*, 28(9), 1408–1422. <https://doi.org/10.1210/ME.2014-1074>
- Petroff, M. G., Chen, L., Phillips, T. A., Azzola, D., Sedlmayr, P., & Hunt, J. S. (2003). B7 Family Molecules Are Favorably Positioned at the Human Maternal-Fetal

Interface. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1496–1504.
<https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.102.010058>

Polgar, B., Kispal, G., Lachmann, M., Paar, G., Nagy, E., Csere, P., Miko, E., Szereday, L., Varga, P., & Szekeres-Bartho, J. (2003). Molecular Cloning and Immunologic Characterization of a Novel cDNA Coding for Progesterone-Induced Blocking Factor. *The Journal of Immunology*, 171(11), 5956–5963.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.11.5956>

Polgár, B., Nagy, E., Va Mikó, E. ', Varga, P., & Lia Szekeres-Barthó, J. (2004). Urinary Progesterone-Induced Blocking Factor Concentration Is Related to Pregnancy Outcome 1. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 71, 1699–1705.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030437>

Putowski, L., Darmochwal-Kolarz, D., Rolinski, J., Oleszczuk, J., & Jakowicki, J. (2004). The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure (Preliminary study). *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 112(2), 192–196.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2003.06.012>

Quenby, S., Nik, H., Innes, B., Lash, G., Turner, M., Drury, J., & Bulmer, J. (2009). Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human Reproduction*, 24(1), 45–54. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEN348>

Quillay, H., El Costa, H., Duriez, M., Marlin, R., Cannou, C., Madec, Y., de Truchis, C., Rahmati, M., Barré-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., & Menu, E. (2016). NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/S12977-016-0271-Z>

- Raghupathy, R. (1997). Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*, 18(10), 478–482. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01127-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01127-4)
- Raghupathy, R., Al Mutawa, E., Makhseed, M., Azizieh, F., & Szekeres-Bartho, J. (2005). Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112(8), 1096–1101. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.2005.00633.X>
- Rautajoki, K. J., Kyläniemi, M. K., Raghav, S. K., Rao, K., & Lahesmaa, R. (2008). An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Annals of Medicine*, 40(5), 322–335. <https://doi.org/10.1080/07853890802068582>
- Rezaei, A., & Dabbagh, A. (2002). T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion - PubMed. *Medical Science Monitor*, 8, 607–610. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12165750/>
- Roussev, R. G., Higgins, N. G., & McIntyre, J. A. (1993). Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 25(1), 15–29. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(93\)90039-K](https://doi.org/10.1016/0165-0378(93)90039-K)
- RUKAVINA, D., RUBEŠA, G., GUDELJ, L., HALLER, H., & PODACK, E. R. (1995). Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 33(5), 394–404. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1995.TB00908.X>

- Shakhar, K., Ben-Eliyahu, S., Loewenthal, R., Rosenne, E., & Carp, H. (2003). Differences in number and activity of peripheral natural killer cells in primary versus secondary recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*, *80*(2), 368–375. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00611-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00611-3)
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annual Review of Immunology*, *27*, 591–619. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132706>
- Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2013). Exosomes Secreted by Human Placenta Carry Functional Fas Ligand and TRAIL Molecules and Convey Apoptosis in Activated Immune Cells, Suggesting Exosome-Mediated Immune Privilege of the Fetus. *The Journal of Immunology*, *191*(11), 5515–5523. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1301885>
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, *359*(6390), 76–79. <https://doi.org/10.1038/359076A0>
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, *51*(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/JLR.M003657>
- Szekeres-Bartho, J., Autran, B., Debre, P., Andreu, G., Denver, L., & Chaouat, G. (1989). Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant

women's lymphocytes after progesterone induction. *Cellular Immunology*, 122(2), 281–294. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90077-4](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90077-4)

Szekeres-Bartho, J., Barakonyi, A., Par, G., Polgar, B., Palkovics, T., & Szereday, L. (2001). Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International Immunopharmacology*, 1(6), 1037–1048. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00035-2)

SZEKERES-BARTHO, J., FAUST, Z., & VARGA, P. (1995). The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 34(6), 342–348. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1995.TB00962.X>

Szekeres-Bartho, J., Hadnagy, J., & Pacsa, A. S. (1985). The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *Journal of Reproductive Immunology*, 7(2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(85\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0165-0378(85)90066-X)

Szekeres-Bartho, J., Kilar, F., Falkay, G., Csernus, V., Török, A., & Pacsa, A. S. (1985). The Mechanism of the Inhibitory Effect of Progesterone on Lymphocyte Cytotoxicity: I. Progesterone-Treated Lymphocytes Release a Substance Inhibiting Cytotoxicity and Prostaglandin Synthesis. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 9(1), 15–18. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1985.TB00334.X>

Szekeres-Bartho, J., Par, G., Dombay, G., Smart, Y. C., & Volgyi, Z. (1997). The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is

- manifested by modulating NK activity. *Cellular Immunology*, 177(2), 194–199. <https://doi.org/10.1006/CIMM.1997.1090>
- Szekeres-Bartho, J., & Wegmann, T. G. (1996). A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Journal of Reproductive Immunology*, 31(1–2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(96\)00964-3](https://doi.org/10.1016/0165-0378(96)00964-3)
- Tarazona, R., Delgado, E., Guarnizo, M. C., Roncero, R. G., Morgado, S., Sánchez-Correa, B., Gordillo, J. J., DeJulián, J., & Casado, J. G. (2011). Human prostasomes express CD48 and interfere with NK cell function. *Immunobiology*, 216(1–2), 41–46. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2010.03.002>
- Tollenaere, M. A. X., Mailand, N., & Bekker-Jensen, S. (2015). Centriolar satellites: Key mediators of centrosome functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(1), 11–23. <https://doi.org/10.1007/S00018-014-1711-3/FIGURES/2>
- Trundley, A., & Moffett, A. (2004). Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*, 63(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0039.2004.00170.X>
- Van Der Pol, E., Hoekstra, A. G., Sturk, A., Otto, C., Van Leeuwen, T. G., & Nieuwland, R. (2010). Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 8(12), 2596–2607. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2010.04074.X>
- Van Putten, E. G., Akbulut, D., Bertolotti, J., Vos, W. L., Lagendijk, A., & Mosk, A. P. (2011). Scattering lens resolves sub-100 nm structures with visible light. *Physical Review Letters*, 106(19). <https://doi.org/10.1103/PHYSREVLETT.106.193905>

- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., & Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today*, *14*(7), 353–356. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90235-D](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D)
- Yamada, H., Kato, E. H., Kobashi, G., Ebina, Y., Shimada, S., Morikawa, M., Sakuragi, N., & Fujimoto, S. (2001). High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *46*(2), 132–136. <https://doi.org/10.1111/J.8755-8920.2001.460203.X>
- Ye, Y., Vattai, A., Zhang, X., Zhu, J., Thaler, C. J., Mahner, S., Jeschke, U., & von Schönfeldt, V. (2017). Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Pathologies of Female Reproductive Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1651, *18*(8), 1651. <https://doi.org/10.3390/IJMS18081651>
- Zwicker, J. I. (2010). Impedance-based flow cytometry for the measurement of microparticles. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *36*(8), 819–823. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1267035/ID/34>

9. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Összesített impakt faktor: 46,98

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk impakt faktora: 15,694

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények:

Pallinger, E., Bognar, Z., Bodis, J., **Csabai, T.**, Farkas, N., Godony, K., Varnagy, A., Buzas, E., & Szekeres-Barthó, J. (2017). A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Scientific reports*, 7, 39927. <https://doi.org/10.1038/srep39927>

Impakt faktor: 4,122; Besorolás: Q1

Pallinger, E., Bognar, Z., Bogdan, A., **Csabai, T.**, Abraham, H., & Szekeres-Barthó, J. (2018). PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells. *Scientific reports*, 8(1), 4662. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23112-z>

Impakt faktor: 4,011; Besorolás: Q1

Csabai, T., Pallinger, E., Kovacs, A. F., Miko, E., Bognar, Z., & Szekeres-Barthó, J. (2020). Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice. *Frontiers in immunology*, 11, 349. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00349>

Impakt faktor: 7,561; Besorolás: Q1

Egyéb közlemények:

Mori, M., Bogdan, A., Balassa, T., **Csabai, T.**, & Szekeres-Barthó, J. (2016). The decidua—the maternal bed embracing the embryo—maintains the pregnancy. *Seminars in immunopathology*, 38(6), 635–649. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0574-0>

Impakt faktor: 5,296; Besorolás: Q1

Bognár Zoltán, Szekeres-Barthó Júlia, **Csabai Tímea**, Pállinger Éva, Gödöny Krisztina, Bódis József (2017). Az implantáció eredményességének javítását célzó humán kutatások állatmodellje. *MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA* 80: 4 pp. 166-174., 9 p.

Impakt faktor: 0; Besorolás: nincs

Bognar, Z., **Csabai, T. J.**, Pallinger, E., Balassa, T., Farkas, N., Schmidt, J., Görgey, E., Berta, G., Szekeres-Barthó, J., & Bodis, J. (2019). The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos. *Journal of reproductive immunology*, 132, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2019.02.003>

Impakt faktor: 4,018; Besorolás: Q1

Szekeres-Barthó, J., **Csabai, T.**, & Gorgey, E. (2021). *Biologia futura*: embryo-maternal communication via progesterone-induced blocking factor (PIBF) positive embryo-derived extracellular vesicles. Their role in maternal immunomodulation. *Biologia futura*, 72(1), 69–74. <https://doi.org/10.1007/s42977-020-00060-2>

Impakt faktor: 1,653; Besorolás: Q3

Ahmadi, H., **Csabai, T.**, Gorgey, E., Rashidiani, S., Parhizkar, F., & Aghebati-Maleki, L. (2022). Composition and effects of seminal plasma in the female reproductive tracts on implantation of human embryos. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 151, 113065. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113065>

Impakt faktor: 7,419; Besorolás: Q1

Bognár, Z., **Csabai-Tanics, T. J.**, Görgey, É., Mikó, É., Horváth-Szalai, Z., & Szekeres-Barthó, J. (2023). The effect of calcitriol on the development and implantation capacity of embryos from hyper-stimulated mice. *Frontiers in immunology*, 14, 1200704. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1200704>

Impakt faktor: 7,3; Besorolás: Q1

Ahmadi, H., Aghebati-Maleki, L., Rashidiani, S., **Csabai, T.**, Nnaemeka, O. B., & Szekeres-Barthó, J. (2023). Long-Term Effects of ART on the Health of the Offspring. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13564. <https://doi.org/10.3390/ijms241713564>

Impakt faktor: 5,6; Besorolás: Q1

Konferencia absztraktok:

TJ. Csabai, Z. Bognar, Zs. Csizmadia, B. Polgár, J. Szekeres-Barthó. A mouse model for testing markers of successful in vitro fertilization in embryo culture media. *Journal of Reproductive Immunology* 101-102 pp. 48-48. Paper: P17, 1 p. (2014)

2014. március 29.- 2014. április 1. 11. ESRI (European Society of Reproductive Immunology) Kongresszus, Budapest, Magyarország (Poszter prezentáció)

Balassa Tímea, Polgar Beata, **Csabai Tímea**, Bognar Zoltan, Szekeres-Bartho Julia
Expression of progesterone-induced blocking factor (PIBF) in preimplantation mouse embryos. *Journal of Reproductive Immunology* 101 pp. 46-46., 1 p. (2014)

2014. március 29.- 2014. április 1. 11. ESRI (European Society of Reproductive Immunology) Kongresszus, Budapest, Magyarország (Poszter prezentáció)

Csabai Tímea Judith, Zoltán Bognár, Beáta Polgár, Zsuzsanna Csizmadia, Tímea Balassa, Júlia Szekeres-Barthó. Appearance of implantation-related markers in pre-implantation mouse embryos. *Immunológiai Szemle* 3-4 pp. 13-13., 1 p. (2014)

2014. október 15-17. Magyar Immunológus Társaság 43. Vándorgyűlése, Velence, Magyarország (Előadás)

Csabai TJ, Bognar Z, Polgar B, Csizmadia Z, Balassa T, Szekeres-Bartho J. Implantation-related markers in pre-implantational mouse embryos. *Journal of Reproductive Immunology* 111 pp. 19-19., 1 p. (2015)

2015. szeptember 21-24. ESRI (European Society of Reproductive Immunology) Kongresszus, Oxford, UK (Poszter prezentáció)

Csabai Tímea Judith, Bognár Zoltán, Polgár Beáta, Csizmadia Zsuzsanna, Balassa Tímea, Szekeres-Barthó Júlia. Az implantációban szerepet játszó markerek megjelenése a pre-implantációs egér embriókban.

2015. november 20. A Magyar Reproductív Immunológiai Társaság IV. kongresszusa, Budapest, Magyarország (Előadás)

Csabai Tímea Judith, Bognár Zoltán, Szekeres-Barthó Júlia. Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) Szerepe az Implantációban

2017. február 4. A Magyar Reproductív Immunológiai Társaság V. kongresszusa, Budapest, Magyarország (Előadás)

Bognar Z, **Csabai TJ**, Bodis J, Gorgey E, Szekeres-Bartho J. The effect of overdosed light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of mouse embryos. *Journal of Reproductive Immunology* 122 pp. 37-37. Paper: O2, 1 p. (2017)

2017. szeptember 29.-október 2. ESRI (European Society of Reproductive Immunology) Kongresszus, Kos, Görögország (Előadás)

Csabai Tímea Judith, Bognár Zoltán, Szekeres-Barthó Júlia. Progesteron Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) Szerepe az Implantációban

2018. január 19-20. A Magyar Reprodukív Immunológiai Társaság VI. kongresszusa, Kecskemét, Magyarország (Előadás)

Zoltan Bognar, **Tímea Judith Csabai**, Eva Pallinger, Nelli Farkas, Janos Schmidt, Eva Görgey, Gergely Berta, Jozsef Bodis, Julia Szekeres-Bartho. The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos

2018. augusztus 28-31. ESRI (European Society of Reproductive Immunology) Kongresszus, Aalborg, Dánia (Előadás)

Csabai Tímea Judith, Bognár Zoltán, Pállinger Éva, Görgey Éva, Szekeres-Barthó Júlia. A fényterhelés hatásának vizsgálata az embriók fejlődésére és implantációs kapacitására egérmodellben

2019. március 29-30. A Magyar Reprodukív Immunológiai Társaság VII. kongresszusa, Budapest, Magyarország (Előadás)

Csabai T., Pállinger É., Kovács Á., Mikó É., Bognár Z., Szekeres-Barthó J. Immunológiai változás és implantációs zavar PIBF deficiens egérmodellben

2020. október 7-8. Magyar Immunológiai Társaság online konferencia (Előadás)

Tímea Csabai: Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice

2020. november 18-20. Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove 17. Nemzetközi Orvosi Posztgraduális konferencia. Eredmény: 2. Helyezés

Zoltán Bognár, **Tímea Judith Csabai-Tanics**, Éva Görgey, Júlia Szekeres-Barthó. Effect of active form of vitamin D (1,25(OH)₂D₃, Calcitriol) on development of follicles and oocytes as well as cleavage of embryos in vitro in superovulated mice.

2022. március 29.-április 1. 16th European Society for Reproductive Immunology Kongresszus, Párizs, Franciaország (Poszter)

Zoltán Bognár, **Tímea Judith Csabai-Tanics**, Éva Görgey, Júlia Szekeres-Barthó. The effect of Calcitriol on the development and implantation capacity of embryos from hyperstimulated mice

2023. szeptember 14-17. 15th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction, Hamburg, Németország (Előadás)

10. TÁMOGATÁSOK

HRNL

Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium

TKP-2021-EGA-10 sz.

Biomarkerek azonosítása a hormonális- és az immunrendszer nyomon követésére:
diagnosztikai eljárások fejlesztése biotechnológiai módszerekkel

2019. Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program II.

Biomarkerek azonosítása a hormonális- és az immunrendszer nyomon követésére:
diagnosztikai eljárások fejlesztése biotechnológiai módszerekkel

20765/3/2018/FEKUTSTRAT Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program

Biomarkerek azonosítása a hormonális- és az immunrendszer nyomon követésére:
diagnosztikai eljárások fejlesztése biotechnológiai módszerekkel

GINOP-2.3.2-15-2016-00021

Chip-technológia alkalmazása a humán in vitro fertilizáció eredményességének javításában

ÁOK Kutatási Alap pályázat

TÁMOP 4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0004

Mesterséges megtermékenyítés sikerességének növelése non-invazív módszerekkel

TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001

TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053

Mesterséges megtermékenyítés sikerességét befolyásoló tápoldat-markerek vizsgálata


11. MELLÉKLETEK

Pallinger, E., Bogнар, Z., Bodis, J., **Csabai, T.**, Farkas, N., Godony, K., Varnagy, A., Buzas, E., & Szekeres-Barthó, J. (2017). A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Scientific reports*, 7, 39927. <https://doi.org/10.1038/srep39927>

Pallinger, E., Bogнар, Z., Bogdan, A., **Csabai, T.**, Abraham, H., & Szekeres-Barthó, J. (2018). PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells. *Scientific reports*, 8(1), 4662. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23112-z>

Csabai, T., Pallinger, E., Kovacs, A. F., Miko, E., Bogнар, Z., & Szekeres-Barthó, J. (2020). Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice. *Frontiers in immunology*, 11, 349. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00349>

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer

Received: 15 September 2016

Accepted: 29 November 2016

Published: 06 January 2017

Eva Pallinger¹, Zoltan Bogнар^{2,3,4}, Jozsef Bodis^{4,5,6}, Tímea Csabai^{2,3,4}, Nelli Farkas⁷, Krisztina Godony⁵, Akos Varnagy^{4,5,6}, Edit Buzas¹ & Julia Szekeres-Bartho^{2,3,4,6}

Multiple pregnancy is a risk for prematurity and preterm birth. The goal of assisted reproduction is to achieve a single pregnancy, by transferring a single embryo. This requires improved methods to identify the competent embryo. Here, we describe such a test, based on flow cytometric determination of the nucleic acid (PI+) containing extracellular vesicle (EV) count in day 5 embryo culture media. 88 women undergoing IVF were included in the study. More than 1 embryos were transferred to most patients. In 58 women, the transfer resulted in clinical pregnancy, whereas in 30 women in implantation failure. In 112 culture media of embryos from the “clinical pregnancy” group, the number of PI+ EVs was significantly lower than in those of 49 embryos, from the “implantation failure” group. In 14 women, transfer of a single embryo resulted in a singleton pregnancy, or, transfer of two embryos in twin pregnancy. The culture media of 19 out of the 20 “confirmed competent” embryos contained a lower level of PI+ EVs than the cut off level, suggesting that the competent embryo can indeed be identified by low PI+ EV counts. We developed a noninvasive, simple, inexpensive, quick test, which identifies the embryos that are most likely to implant.

The efficiency of embryo implantation is surprisingly low in humans. This can either be attributed to the high rate of chromosomally abnormal embryos, or to uterine factors, if the embryo is chromosomally normal. Ideally, a competent embryo should have good chances to implant into a receptive endometrium. However, successful outcome is also related to the age of the mother. The percentage of aneuploidy embryos increases with maternal age, reaching 80% over the age of 40^{1–4}, and many of these chromosomally abnormal embryos fail to implant^{5–9}, which explains that according to a rather conservative estimate only 50% of human conceptions will result in pregnancy¹⁰.

In an attempt to increase the chances of pregnancy in infertile women, many *in vitro* fertilization (IVF) centres transfer more than one embryos. This in turn also increases the hazard of twin pregnancies. Multiple pregnancies are among the most common causes of preterm birth, along with the increased risk for prematurity. Therefore, it would be of importance to select the embryo that is most likely to implant and to transfer that particular embryo only.

Enormous efforts have been devoted to finding the appropriate method to identify the competent embryo. Selection, based on the morphological features of the embryo^{11–13} is highly prone to subjectivity¹⁴. Morphokinetic measurements provide more objective data^{15,16}. By using time-lapse imaging, the development of the embryo can be observed in a closed system, and thus, in contrast to morphological evaluation, in this case the culture conditions are stable. Some studies reported an elevated pregnancy rate when morphokinetic parameters were used for embryo selection, however, large randomized trials are still missing¹⁷.

Invasive methods, such as pre-implantation genetic screening for aneuploidy involve certain risks, since biopsy might negatively influence further development of the embryo¹⁸. Randomized trials performed with

¹Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary. ²Department of Medical Biology, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary. ³János Szentágothai Research Centre, University of Pecs, Hungary. ⁴Endocrine Studies, Centre of Excellence, Pecs University, Pecs, Hungary. ⁵Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary. ⁶MTA - PTE Human Reproduction Research Group, Pecs, Hungary. ⁷Institute of Bioanalysis, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.S.-B. (email: szekeres.julia@pte.hu)

cleavage stage embryos did not show a beneficial effect on implantation and pregnancy rates^{19–21}, partly because of chromosomal mosaicism, - the blastomere analysed, does not reflect the situation in the whole embryo²², or because since cleavage stage embryos are most vulnerable to invasive interventions, the biopsy itself might have contributed to the failure to show positive results¹⁸.

Analysis of embryo culture media is based on detection of changes in the spent embryo culture medium that would reflect the functional state and vitality of the embryo^{23–26}. Recently, Monstko, *et al.*²⁷ reported a 100% identification of non-viable embryos by the presence of a haptoglobin fragment in embryo culture medium. Although only 55% of successfully implanting embryos could be identified, this approach would still be a useful tool for embryo selection. However liquid chromatography together with mass spectrometry can hardly be expected to become available for routine use in IVF centres. Unfortunately, tests detecting the glucose or amino acid metabolism or oxygen consumption of the embryo also require sophisticated equipment. Therefore, they are not suitable for high throughput routine screening.

The ideal test should be non-invasive, simple and quick, so that it could be performed immediately, before fresh transfer.

Tannetta *et al.* suggested that preimplantation embryos might produce extracellular vesicles, however they point out that *in vitro* fertilization (IVF) culture media alone contains high levels of EVs, possibly from the nutrients supplemented for embryo growth²⁸.

Extracellular vesicles (EVs) are phospholipid bilayer enclosed structures which are constitutively produced by both eukaryotic and prokaryotic cells. Among EVs exosomes are the smallest particles, with a diameter of approximately 100 nm or less. Microvesicles range from 100 to 800 nm and apoptotic bodies are larger than 1000 nm. On the basis of their specific exofacial and intra-vesicular molecular pattern (DNA, RNA and protein), EVs play important role in intercellular communication, both in physiological and pathological processes. EVs are detectable in body fluids including peripheral blood, urine, cerebrospinal fluid, synovial fluid, or amniotic fluid. Although most if not all cell types can produce any subpopulations of EVs, the different vesicles are induced by various stimuli^{29,30}. Several methods are used for the assessment of the size distribution, morphology, molecular pattern, and cellular origin of EVs. The most often used detection techniques are Western blotting, nanoparticle tracking analysis (NTA), tunable resistive pulse sensing (TRPS), electron microscopy (EM) and flow cytometry.

The latter is an ideal, high-throughput method, suitable for multiparametric characterization of EVs³¹.

This study has set the goals i) to characterize embryo-derived EVs in embryo culture media by flow cytometry, ii) to correlate the characteristics of embryo-derived EVs with implantation potential and iii) to prove the applicability of the embryo-derived EVs as biomarkers in the prediction of the implantation potential.

Methods

Patients, sample collection. Eighty eight unselected infertile patients enrolled in the IVF program, were included in the study. The study was approved by the Human Reproduction Committee of the Hungarian Medical Research Council and the Ethical Committee of Pecs University. Informed consent was obtained from each patient. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

For controlled ovarian hyperstimulation follicles were synchronized with the GnRh agonist triptorelin (Gonapeptyl; Ferring®, Germany) in either a long or short protocol. Follicle stimulation was performed with individual dosages of rFSH (Gonal-F; Serono® Aubonne, Switzerland), varying from 112 to 225 IU per day. Final oocyte maturation was induced by injection of 250 µg of hCG (Ovitrelle; Serono® Aubonne, Switzerland). Oocytes were harvested 36 hours later by ultrasonographically guided puncture of the follicles. Fertilization was performed with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) if sperm count was less than 15 M/ml, or the maternal age was higher than 35 years or if the number of the previous treatment cycles of the patient were more than two.

Embryos were cultured individually for 3 days under oil in G-1 medium. Then the medium was replaced by 40 µl of G-2 medium and the embryos were further cultured under oil till day 5. In the morning of day 5 (the day of the transfer) as much as possible of the spent medium was collected, and stored at –80 °C until used for EV determination. Oil (Ovoil), G-1 and G-2 medium were purchased from Vitrolife®, Göteborg, Sweden.

Embryos were transferred 3 or 5 days after the oocyte retrieval, however, only day 5 media from embryos transferred on day 5 were included in this study. The embryos to be transferred were selected by morphological criteria, using the Istanbul Consensus embryo scoring system of ESHRE³². If possible, only expanded blastocysts with Grade 1 ICM and TE were transferred.

Implantation was confirmed by ultrasonography four weeks after the transfer. Clinical pregnancy is defined by the presence of foetal heartbeat, and implantation failure by the lack of the former, together with the lack of beta hCG on week 2 after the transfer.

Flow cytometry. Measurements were carried out using a BD FACSCalibur (BD Biosciences) flow cytometer. All the FACS data were analyzed with CellQuestPro software. The instrument settings and gates were defined by Megamix-Plus SSC beads (Biotex, France) and were optimized with 1 µm Silica Beads Fluo-Green Green (Kisker Biotech GmbH & Co; Steinfurt, Germany). (Supplementary Figure 1). The single-platform flow cytometric determination of the absolute number of EVs was performed by adding internal counting standard beads (Sysmex Partec GmbH; Germany) to IVF conditioned medium samples. The absolute number of EVs was calculated using the following formula:

$$\text{Absolute EV Count (EVs/}\mu\text{L)} = (\text{Number of EV events/Number of bead events}) \times \text{Concentration of beads (beads/}\mu\text{L)}$$

For Annexin V staining 2 µl IVF conditioned medium was diluted with 250 µl annexin binding buffer (BD Biosciences, San Jose, USA) and incubated for 10 minutes at room temperature with 1 µl phycoerythrin

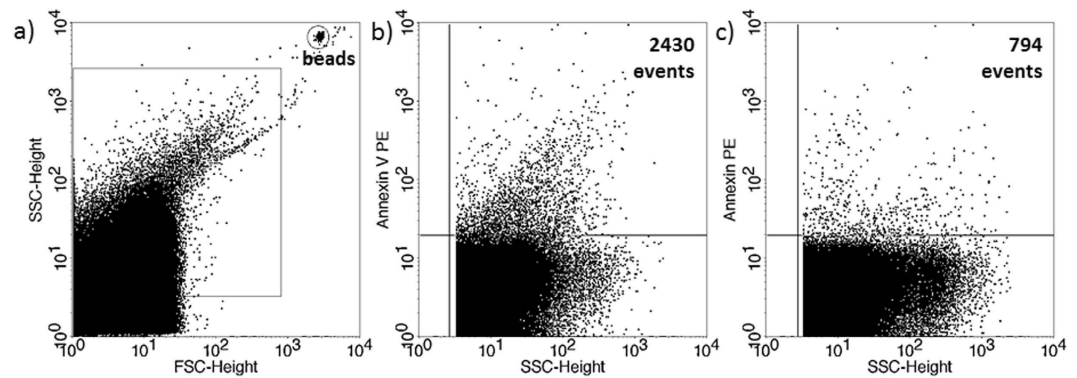


Figure 1. Annexin V staining of embryo-derived EVs in embryo culture medium. (a) Representative FSC-SSC dot plot shows the size distribution of EVs in embryo culture medium. (b) Representative dot plot shows the phycoerythrin (PE) fluorescence of EVs after Annexin V-PE labelling. (c) Representative dot plot shows the PE fluorescence after Triton-X 100 differential detergent lysis.

conjugated Annexin V (BD Biosciences, San Jose, USA). Fifty μ l Count Check Beads (Sysmex Partec GmbH) was also added for determination of the number of EVs. To confirm the presence of EVs, we applied Triton-X differential detergent lysis using a final concentration of 0.1%. Only events that disappeared in the presence of 0.1% Triton-X 100 were considered as vesicles^{33,34}.

Propidium iodide (PI) was used for the labelling of the nucleic acid content of embryo-derived EVs. PI is a fluorescent intercalating agent which is commonly used as a DNA stain for flow cytometry. Twenty five μ l of conditioned embryo culture media was used for the measurements. Embryo culture media were incubated for 15 minutes at room temperature with 100 μ l 4% formaldehyde (from paraformaldehyde (PFA) solution). At the end of the incubation, 150 μ l filtered PBS and 1 μ l PI solution (50 μ g/ml) and 50 μ l Count Check beads (Sysmex Partec GmbH) were added to the sample. FACS analysis was carried out within 30 minutes after PI staining. Unstained samples were used for the detection of autofluorescence. Empty G-1 and G-2 medium and oil for embryo culture were also incubated together PI dye for determination of the specificity of DNA labelling method. (Supplementary Figure 2). The single-platform flow cytometric determination of the absolute number of EVs was performed by adding internal counting standard beads (Sysmex Partec GmbH; Germany) to IVF conditioned medium samples.

Confirmation of the presence of EVs in IVF medium by using transmission electron microscopy.

Pooled samples (2 IVF medium) were used for transmission electron microscopic analysis. After centrifugation of pooled samples (20500 g, 20 minutes), the supernatant was carefully removed and the pellet was fixed at room temperature for 30 min with 4% formaldehyde, in 0.01 M phosphate buffer (PBS) at pH 7.4). After washing with phosphate buffer several times, the preparations were postfixed in 1% OsO₄ (Taab; Aldermaston, Berks, UK) for 30 min. Following washing with distilled water, the pellets were dehydrated in graded ethanol, including block-staining with 2% uranyl acetate in 70% ethanol for 30 min, and embedded in Taab 812 (Taab). Ultrathin sections were examined in a Hitachi 7100 transmission electron microscope (Hitachi Corporation, Japan). Electron micrographs were taken at the same magnification (40,000).

Statistical analysis. The distribution of the PI positive (PI+) EVs was tested with the Kolmogorov-Smirnov's test, which showed a nonparametric distribution. To determine differences between the groups the Mann-Whitney test was used. Receiver operating curve (ROC) analyses was used evaluate the diagnostic ability of test, and the optimal cut-off score was set by the Youden index³⁵. P-values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Cultured human embryos release EVs. The presence of EVs in culture media of *in vitro* fertilized human embryos was demonstrated by flow cytometry. Although phosphatidylserine is predominantly located in the inner leaflet of the plasma membrane, it is externalized in EVs, thus it could be stained by Annexin V. To confirm the flow cytometric detection of Annexin V positive EVs, we used Triton-X differential detergent lysis. Only the events sensitive to 0.1% Triton-X 100 were considered as EVs (Fig. 1). Nucleic acid-containing embryo-derived EVs could be detected by Propidium iodide (PI) after fixation of vesicle membrane (Fig. 2). The presence of EVs was also confirmed with transmission electron microscopy (Supplementary Figure 3).

The number of PI+ EVs is significantly lower in culture media of competent-, than in those of failed embryos. Eighty eight infertile women were included in the study. To increase the chances of viable pregnancy, according to the national legislation in most cases two or three embryos were transferred simultaneously.

Two groups were formed according to the outcome;

- 1) Implantation failure N = 30.
- 2) clinical pregnancy N = 58.

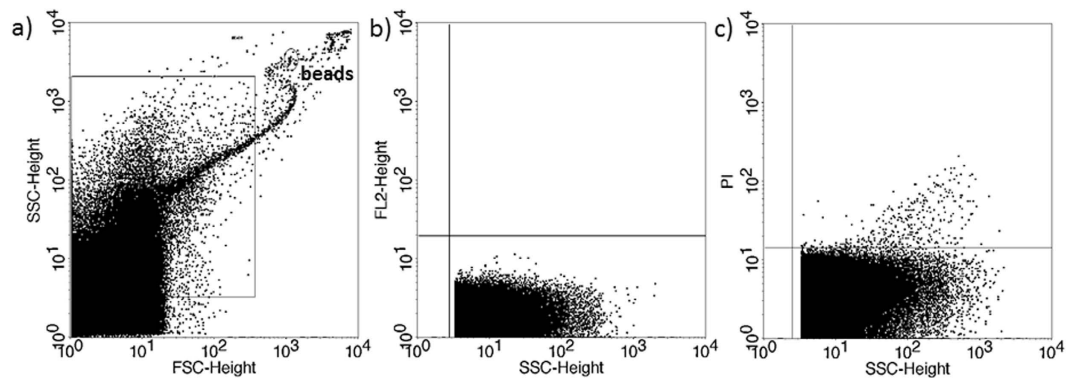


Figure 2. Propidium iodide (PI) staining of embryo-derived EVs in embryo culture medium. (a) Representative FSC-SSC dot plot shows the size distribution of EVs in embryo culture medium. (b) Representative dot plot shows the autofluorescence of embryo culture medium in FL2 channel (embryo culture medium + 4% formaldehyde solution + PI, without EVs). (c) Representative dot plot shows the PI fluorescence of 4% formaldehyde fixed embryo-derived EVs in embryo culture medium.

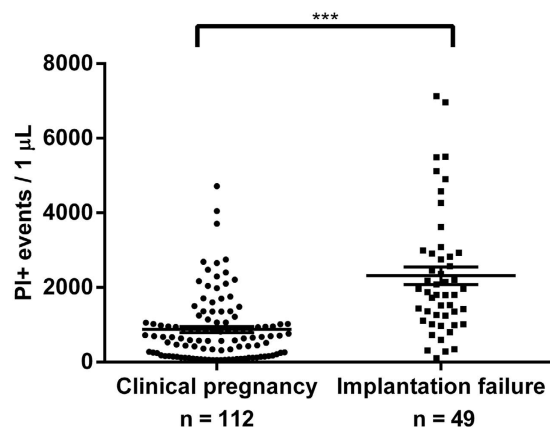


Figure 3. Propidium iodide (PI)+ EVs in culture medium of embryos resulting in clinical pregnancy or implantation failure. *** $P < 0.001$.

The number of PI+ EVs was significantly ($p < 0.001$) lower in the 5th day culture media of embryos from the “clinical pregnancy” group ($N = 112$), than in those of embryos, that failed to implant ($N = 49$) (Fig. 3).

Identification of competent embryos by determining the number of PI+ EVs in day 5 culture medium. Transfer of 112 embryos to 58 women resulted in 64 implantations. Two embryos were transferred to 45 women, three to 5 women and a single embryo to 8 women. (One sample was used for other purposes, not included in the statistics).

If transfer of two embryos resulted in a singleton pregnancy, the culture media from one of the transferred embryos contained considerably less PI+ EVs than the other (Fig. 4), while, if transfer of two embryos resulted in implantation failure, culture media of both embryos contained a high number of PI+ EVs (Fig. 5).

In 6 cases transfer of two embryos resulted in twin pregnancy. The culture media of both embryos contained a low number of PI+ EVs (Fig. 6).

Based on these data we assume that the embryos releasing lower number of PI+ EVs were the ones that implanted.

When transfer of more embryos resulted in singleton pregnancies, PI+ EV counts were lower in one of the embryo culture media than in the others.

When culture media with lower number of PI+ EVs were analysed against culture media of embryos with higher number of PI+ EVs within the “clinical pregnancy” group, there was a significant difference ($p < 0.001$) between the lower PI+ EV and higher PI+ EV groups (Fig. 7). In 8 cases, transfer of a single embryo resulted in a singleton pregnancy, and in 6 cases, the transfer of two embryos ended up in a twin pregnancy. All of these “confirmed competent” embryos contained low PI+ EV counts (Fig. 7). This confirms, that the competent embryo can indeed be identified by lower PI+ EV counts.

These data also suggest, that if there is a marked difference in the PI+ EV counts in the culture media of different embryos from the same mother, it is the embryo with lower number of nucleic acid-containing EVs that is more likely to implant.

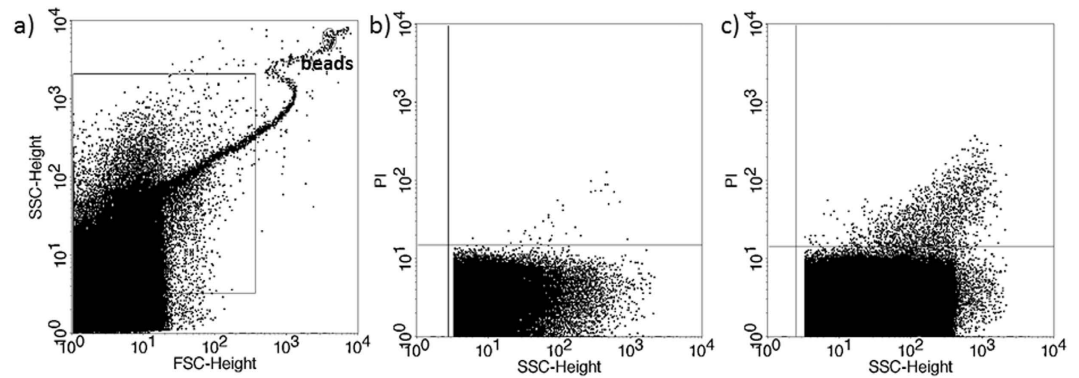


Figure 4. Propidium iodide (PI) staining of embryo-derived EVs in embryo culture medium. Two transferred embryos resulting in singleton pregnancy. (a) Representative FSC-SSC dot plot shows the size distribution of EVs in embryo culture medium. (b,c) dot plots show the PI fluorescence of EVs transferred to the same mother.

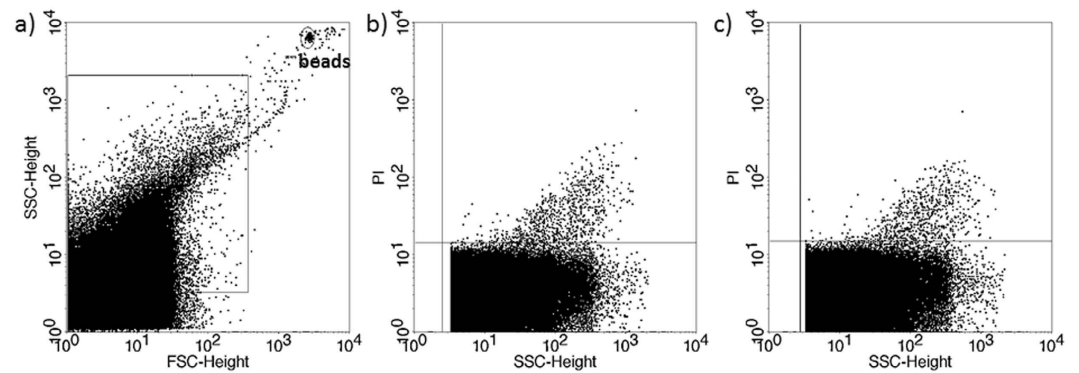


Figure 5. Propidium iodide (PI) staining of embryo-derived EVs in embryo culture medium. Two transferred embryos resulting in pregnancy failure. (a) Representative FSC-SSC dot plot shows the size distribution of EVs in embryo culture medium. (a,c) dot plots show the PI fluorescence of EVs transferred to the same mother.

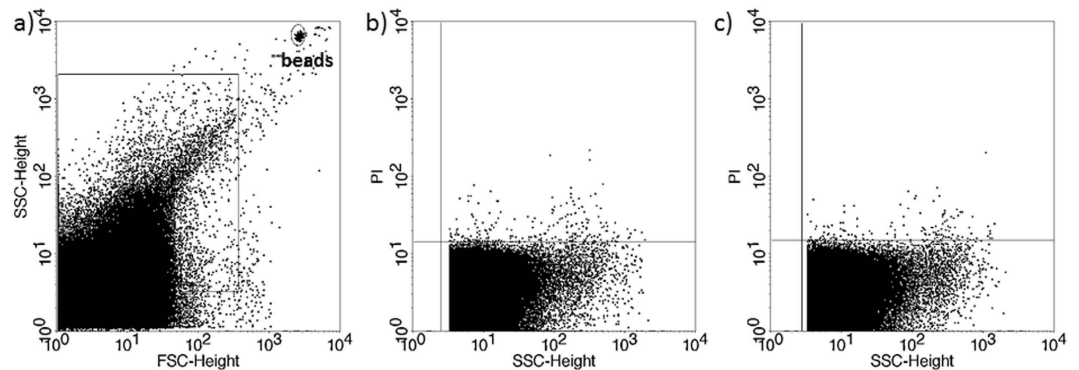


Figure 6. Propidium iodide (PI) staining of embryo-derived EVs in embryo culture medium. Two transferred embryos, resulting in twin pregnancy. (a) Representative FSC-SSC dot plot shows the size distribution of EVs in embryo culture medium. (b,c) dot plots show the PI fluorescence of EVs transferred to the same mother.

A cut off level for identifying the competent embryos. ROC analysis was performed using different data sets. Plotting data of confirmed competent embryos versus data from implantation failure (Fig. 8a) yielded a cut off level of 957 PI+ EV count that corresponded to a maximum specificity and sensitivity. The AUC (area under the curve) was 0.91, (95% CI: 0.842–0.978). Sensitivity; 0.9 specificity; 0.857.

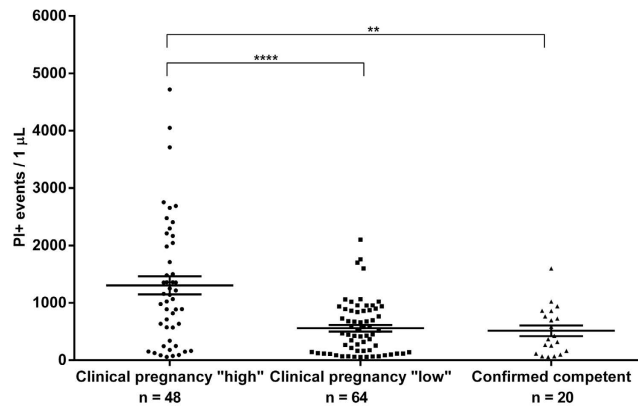


Figure 7. Culture media of embryos from clinical pregnancies with higher (N = 48) or lower (N = 64) number of PI+ EVs. * $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.**

Plotting data from presumed competent embryos (giving the lowest PI+ EV values among embryos from the same mother) against data from implantation failure (Fig. 8b) resulted in a cut off level of 964. The AUC was 0.899 (95% CI: 0.837–0.960) Sensitivity; 0.875 specificity; 0.857.

Plotting data from presumed competent embryos against data from presumed incompetent embryos in the clinical pregnancy group, plus data from the implantation failure group (Fig. 8c). The cut off value was 1063, the AUC was 0.806 (95% CI: 0.740–0.873) Sensitivity; 0.9375 specificity; 0.639.

The AUC is a measure of how well a parameter can distinguish between two diagnostic groups. The present values show a very good distinction.

When the cut off was set at 964 PI+ EVs, the culture media of 8 (12.5%) out of 64 potentially competent embryos contained a higher number of PI+ EVs than the cut off, whereas in 7 (14%) of the 49 samples from the implantation failure group PI+ EV counts fell below the cut off level. The culture media of 19 out of the 20 “confirmed competent” embryos contained lower PI+ EV counts than the cut off level.

Based on these data, the embryo to be transferred should be the one with the lowest PI+ EV count among all the embryos from the same mother. The question is, how many of such embryos have a higher PI+ EV count, than the cut off level, in other words; what is the chance for false positivity. In the present study, 8 (12.5%) of the 64 supposedly competent embryos were falsely diagnosed. Therefore, when an IVF specialist transfers the embryo with the lowest PI+ EV count, the chances of implantation are close to 90%, provided the maternal side is receptive.

Discussion

Due to the increasing rate of infertility in developed countries, assisted reproduction has become a routine procedure. Transferring a single competent embryo, is crucial for avoiding multiple pregnancies, however to achieve this goal, no reliable method is available to identify the competent embryo at present. A major disadvantage of aneuploidy screening is its invasive nature¹⁸, selection based on embryo morphology^{11–13} is subjective and morphology does not always correlate with implantation potential¹⁴. Analysis of embryo culture media based on the supposedly different metabolic activity of competent and incompetent embryos is time consuming and requires sophisticated equipment^{23–27}.

Here, we describe a non-invasive, simple, inexpensive, and most importantly quick test, to identify the embryos that are most likely to implant in a receptive endometrium. Less than 1 h is required to test 15 embryo culture media, thus the test can easily be performed before fresh transfer. A clear disadvantage of the method is, that a flow cytometer is an expensive equipment. On the other hand; given the short time required for performing the test, the IVF centre does not necessarily be equipped with a flow cytometer. Measurements can be done in a nearby flow cytometric core facility. We used culture media of day 5 embryos, because if the embryo is cultured *in vitro* till it develops into blastocyst, the developmental uncertainties of cleavage stage embryo development can be eliminated. Furthermore, the implantation potential of the blastocyst seems to be better than, that of cleavage stage embryos. A single-blastocyst transfer is much more likely to result in a singleton live birth, than transfer of a single good-quality cleavage-stage embryo on day 3^{12,36}. Therefore, simply allowing the embryo to reach the blastocyst stage, might improve the implantation rate in a fresh transfer.

In this study we showed that *in vitro* fertilized embryos release detectable numbers of extracellular vesicles, into the culture media, and a part of these contain nucleic acid detectable by PI staining. The origin of the nucleic acid has not been investigated in this study, but a possible explanation could be that it is released due to cell damage, thus the higher number of nucleic acid containing EVs reflect the impairment of the embryo.

We demonstrated that when the transfer of multiple embryos resulted in singleton pregnancies, PI+ EV counts were lower in one of the embryo culture media than in the others. Based on these data we assumed that the embryos releasing lower number of PI+ EVs were the ones that implanted. To prove this concept, we collected the culture media of embryos, with a known outcome of the transfers. Culture media from twenty embryos from either single transfers resulting in clinical pregnancies, or from transfer of two embryos resulting in twin pregnancies were tested. Nineteen of these 20 “confirmed competent” embryos produced lower than the cut-off

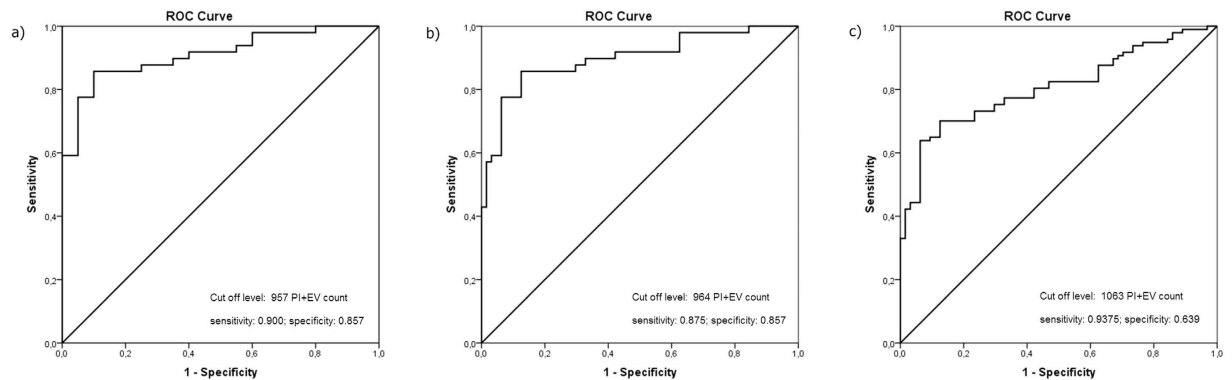


Figure 8. Evaluation of optimal cut-off score and the diagnostic ability of test by ROC analysis. (a) Data of confirmed competent embryos are plotted in function of data from implantation failure. **(b)** Data from presumed competent embryos (giving the lowest PI+ EV values among embryos from the same mother) are plotted against data from implantation failure. **(c)** Data from presumed competent embryos are plotted against data from presumed incompetent embryos in the clinical pregnancy group, plus data from the implantation failure group.

PI+ EV numbers in the culture media, suggesting that determining the number of PI+ EVs in the culture medium is indeed suitable for identifying the competent embryo.

Considering the relatively small sample size, the sensitivity and specificity of the test are acceptable.

Of note; while in the cases resulting in clinical pregnancies, both the maternal side and - at least one - of the embryos must have been competent; in women, with failed implantation, the reason for the failure could be either embryonic, or maternal or both. Therefore, when we compare the PI+ EV content of presumably competent embryos to that of embryos from the implantation failure group, on the latter side we are dealing with a heterogeneous population. In addition to the incompetent embryos, competent embryos might also have been present, which failed to implant, because of endometrial receptivity problems.

The other problem concerns the methodology. Although the method is very simple, the inherent problems of flow cytometry -if not properly handled might cause inconsistent results. Even though flow cytometry is a common method for characterizing EVs, it has many difficulties. Different instruments use different counting methods. There are two trends in flow cytometric absolute counting: 1) the volumetric- and 2) the microbead-based absolute counting. In our experiments microbead-based assessments were applied for FACSCalibur cytometer. In these cases the appropriate sample handling is very important to avoid false results or artefacts. Our data indicate that during microbead-based absolute counting procedures the same type of calibration beads must be used in order to avoid inter-assay variations. In order to achieve the highest sensitivity we also suggest the detection of background noise by the analysis of PI containing empty culture media (Supplementary Figures 1 and 2).

If these problems are taken in account and properly dealt with, this system can be useful in identifying the competent embryo right before fresh transfer.

References

- Munné, S., Alikani, M., Tomkin, G., Grifo, J. & Cohen, J. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*, **64**, 382–391 (1995).
- Magli, M. C., Gianaroli, L. & Ferraretti, A. P. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* **183**(suppl. 1), S29–S34 (2001).
- Márquez, C., Sandalinas, M., Bahçe, M., Alikani, M. & Munné, S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod. BioMed. Online* **1**, 17–26 (2000).
- Bielanska, M., Tan, S. L. & Ao, A. High rate of mixoploidy among human blastocysts cultured *in vitro*. *Fertil. Steril.* **78**, 1248–53 (2002).
- Rai, R. & Regan, L. Recurrent miscarriage. *Lancet*, **368**, 601–611 (2006).
- Mertzanidou, A. *et al.* Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum. Reprod.* **28**, 256–264 (2013).
- Vanneste, E. *et al.* Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med.* **15**, 577–583 (2009).
- Quenby, S., Vince, G., Farquharson, R. & Aplin, J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum. Reprod.* **17**, 1959–1963 (2002).
- Stephenson, M. D., Awartani, K. A. & Robinson, W. P. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum. Reprod.* **17**, 446–451 (2002).
- MacKlon, N. S., Geraedts, J. P. & Fauser, B. C. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update*, **8**, 333–343 (2002).
- Steer, C. V., Mills, C. L., Tan, S. L., Campbell, S. & Edwards, R. G. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an *in-vitro* fertilization and embryo transfer programme. *Hum. Reprod.* **7**, 117–119 (1992).
- Gardner, D. K. & Schoolcraft, W. B. *In vitro* culture of human blastocysts. In *Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond* Jansen, R., Mortimer, D. (eds) Parthenon Publishing, London, pp. 378–388 (1999).
- Gardner, D. K. & Sakkas, D. Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer—a review. *Placenta* **24** (Suppl. B), S5–S12 (2003).
- Montag, M., Liebenthron, J. & Koster, M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* **32**, S252–S256 (2011).

15. Meseguer, M. *et al.* Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil. Steril.* **98**, e10 (2012).
16. Campbell, A. *et al.* Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod. Biomed. Online.* **26** 477–485 (2013).
17. Kirkegaard, K., Hindkjaer, J. J., Grondahl, M. L., Kesmodel, U. S. & Ingerslev, H. J. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J. Assist. Reprod. Genet.* **29**, 565–572 (2012).
18. Scott, R. T. Jr, Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T. & Treff, N. R. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil. Steril.* **100**, 624–30 (2013).
19. Mastenbroek, S. *et al.* *In vitro* fertilization with preimplantation genetic screening. *N. Engl. J. Med.* **357**, 9–17 (2007).
20. Mastenbroek, S. *et al.* What next for preimplantation genetic screening? More randomized controlled trials needed? *Hum. Reprod.* **23**, 2626–2628 (2008).
21. Mastenbroek, S., Twisk, M., van der Veen, F. & Repping, S., Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum. Reprod. Update* **17**, 454–466 (2011).
22. Bielanska, M., Tan, S. L. & Ao, A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum. Reprod.* **17**, 413–419 (2002).
23. Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J. & Schoolcraft, W. B. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil. Steril.* **76**, 1175–1180 (2001).
24. Leese, H. J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* **143**, 417–427 (2012).
25. Lane, M. & Gardner, D. K. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum. Reprod.* **11**, 1975–1978 (1996).
26. Scott, L. *et al.* Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Human oocyte respiration-rate measurement – potential to improve oocyte and embryo selection? *Reprod. Biomed. Online* **17**, 461–469 (2008).
27. Montskó, G. *et al.* Noninvasive embryo viability assessment by quantitation of human haptoglobin alpha-1 fragment in the *in vitro* fertilization culture medium: an additional tool to increase success rate. *Fertil. Steril.* **103**, 687–93 (2015).
28. Tannetta, D., Dragovic, R., Alyahyaie, Z. & Southcombe, J. Extracellular vesicles and reproduction—promotion of successful pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* **11**, 548–563 (2014).
29. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **14**, 27066 (2015).
30. György, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2667–88 (2011).
31. van der Pol, E. *et al.* Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2596–607 (2010).
32. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of R Embryology. The Istanbul consensus workshop of embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum. Reprod.* **0**, 1–14 (2011).
33. György, B. *et al.* Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* **117**, e39–48 (2011).
34. Osteikoetxea, X. *et al.* Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9775–82 (2015).
35. Youden, W. J. An index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**, 32–35 (1950).
36. Papanikolaou, E. G. *et al.* *In vitro* fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1139–1146 (2006).

Acknowledgements

This work was supported by SROP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053 to J.S., SROP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0004 to J.S., and PTE ÁOK-KA 2015-12. We thank dr Agnes Kittel (Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences, Department of Pharmacology, Laboratory of Molecular Pharmacology) for the electron microscopy work.

Author Contributions

Eva Pallinger and Edit Buzas carried out flow cytometric determination of PI+ EVs and evaluated the data. Zoltan Bogнар, Jozsef Bodis, Timea Csabai, Krisztina Godony and Akos Varnagy were responsible for sample collection, handling and providing clinical data, as well as advising in clinical aspects. Nelli Farkas performed statistical analysis. Julia Szekeres-Bartho designed the study, and critically evaluated the results.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Pallinger, E. *et al.* A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Sci. Rep.* **7**, 39927; doi: 10.1038/srep39927 (2017).


Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells

Eva Pallinger¹, Zoltan Bognar^{2,3,5}, Agnes Bogdan^{2,4,5}, Timea Csabai^{2,4,5}, Hajnalka Abraham² & Julia Szekeres-Bartho^{2,3,4,5}

Earlier evidence suggests, that the embryo signals to the maternal immune system. Extracellular vesicles (EVs) are produced by all types of cells, and because they transport different kinds of molecules from one cell to the other, they can be considered as means of intercellular communication. The aim of this work was to test, whether the embryo is able to produce sufficient amounts of EVs to alter the function of peripheral lymphocytes. Embryo-derived EVs were identified by their Annexin V binding capacity, and sensitivity to Triton X dependent lysis, using flow cytometry. Transmission electron microscopy was used to detect EVs at the implantation site. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) expression in embryo-derived EVs was demonstrated with immuno-electron microscopy. The % of IL-10+ murine lymphocytes was determined by flow cytometry. EVs were present in embryo culture media, but not in empty media. Mouse embryo-derived EVs adhere to the surface of both CD4+ and CD8+ murine peripheral T lymphocytes, partly, via phosphatidylserine binding. The number of IL-10+ murine peripheral CD8+ cells increases in the presence of embryo-derived EVs, and this effect is counteracted by pre-treatment of EVs with an anti-PIBF antibody, suggesting that the embryo communicates with the maternal immune system via EVs.

Pregnancy has a profound influence on the functioning of the maternal immune system. Owing to the concerted action of NK cells, regulatory T cells and altered cytokine balance, the developing embryo enjoys a favourable immunological environment throughout gestation. Though later stages of pregnancy have been relatively well characterized in this respect, little is known about the embryo-maternal interactions in the peri-implantation period.

Earlier data suggest, that such an early communication might exist. Daya and Clark demonstrated immunosuppressive factors in embryo culture medium¹ and Kelemen *et al.*² reported increased IL-10 mRNA expression in peripheral lymphocytes incubated with the culture media of fertilized eggs, but not in those, incubated with follicular fluid.

Thus, there is evidence, that the embryo releases signals, to alter the maternal immune functions, from the earliest stages of pregnancy, however, the mechanism of signal transport has not been thoroughly investigated.

In recent years extracellular vesicles (EVs) have received much attention. These membrane-coated structures may express phosphatidylserine (PS) in their membrane³, which reacts with Annexin V.

EVs are produced by all types of cells, and because they transport different kinds of molecules from one cell to the other, they can be considered as means of intercellular communication, and as such, might be considered as candidates for conveying the signal from the embryo to the mother. Earlier, we showed that *in vitro* cultured human embryos produce detectable numbers of EVs⁴, therefore, it seemed plausible, that these structures might be involved in the communication between the embryo and the endometrium during implantation.

EVs originating from various cell types and carrying different molecules can both activate and suppress the function of the immune system, by presenting antigens^{5,6}, MHC molecules⁷⁻¹⁰ or cytokines¹¹⁻¹⁶.

The Progesterone-induced Blocking factor (PIBF) was originally described as a 34 kDa protein produced by peripheral pregnancy lymphocytes. Later it became obvious, that PIBF is expressed by many other cell

¹Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary. ²Department of Medical Biology, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary. ³MTA - PTE Human Reproduction Research Group, Hungarian Academy of Science at Pecs University, Pecs, Hungary. ⁴János Szentágothai Research Centre, Pecs University, Pecs, Hungary. ⁵Endocrine Studies, Centre of Excellence, Pecs University, Pecs, Hungary. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.S.-B. (email: szekeres.julia@pte.hu)

types and plays a role in the feto-maternal communication, partly, by mediating the immunological actions of progesterone¹⁷.

The aim of this work was to test, whether the embryo-derived EVs might carry PIBF, and whether PIBF+ embryo-derived EVs might alter the function of peripheral lymphocytes, this way contributing to the communication between the embryo and the mother in the early stage of pregnancy.

Materials and Methods

Embryo culture. Eight to 12 weeks old CD1 female mice (Charles River, Germany) were injected with 5 IU of FSH (Merional, IBSA Pharma, Switzerland). Forty eight hours later the mice were treated with 5 IU LH (Chloragon, Ferring, Hungary), and directly placed to CD1 males. Twenty four hours after sighting the vaginal plug, two cell stage embryos were flushed from the fallopian tubes, and cultured individually in 50 µl droplets in KSOM medium (Millipore, England), supplemented with 0.4% of BSA, under mineral oil at 37 °C, 5% CO₂, for 72 h, until they reached the blastocyst stage. Culture media were replaced every 24 hours. After 24 h culture, mouse embryos are at the 6–8 cell stage, during a further 24 h of culture they develop into morulae, and an additional 24 h culture period is needed for the embryos to reach the blastocyst stage. At this point the culture media of individual blastocysts were collected, and stored at –80 °C, until used. Media from embryos collected at earlier stages of development were not used in this study.

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. All experimental protocols were approved by the Animal Health Committee of Baranya County.

Flow cytometry. Measurements were carried out using a BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA) flow cytometer, and data were analyzed with CellQuestPro software. The instrument settings and gates were defined by Megamix-Plus SSC beads (Biocytex, France) and were optimized with 1 µm Silica Beads Fluo-Green Green (Kisker Biotech GmbH & Co; Steinfurt, Germany). The single-platform flow cytometric determination of the absolute number of EVs was performed by adding internal counting standard beads (Sysmex Partec GmbH; Germany) to embryo culture medium samples. The absolute number of EVs was calculated using the following formula:

$$\text{Absolute EV Count (ENs/}\mu\text{L)} = \left(\frac{\text{Number of EV event}}{\text{Number of bead event}} \right) \times \text{Concentration of bead (bead/L)}$$

EVs were identified by Annexin V binding to PS expressed by the vesicle membranes. For Annexin V staining 2 µl of embryo culture medium was diluted with 250 µl of annexin binding buffer (BD Biosciences, San Jose, USA) and incubated for 10 minutes at room temperature with 1 µl of phycoerythrin conjugated Annexin V (BD Biosciences, San Jose, USA). Fifty µl Count Check Beads (Sysmex Partec GmbH) was also added for determination of the number of EVs. To confirm the presence of EVs, we applied Triton-X differential detergent lysis using a final concentration of 0.1% as described by György *et al.*¹⁸. Because the detergent lyses the membrane of the vesicles, events that disappeared in the presence of 0.1% Triton-X 100 were considered as EVs^{18,19}. Empty medium (culture medium that did not contain embryos, but was otherwise treated under the same conditions as embryo culture medium) was used as negative control.

Electron microscopy. The presence of EVs at the feto-maternal interface in day 5 murine pregnancy was confirmed using transmission electron microscopy. Approximately 1 mm³ uterine tissues from day 5 murine pregnancy were washed in PBS, fixed with 2.5% glutaraldehyde diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) overnight at 4 °C. After washing with PBS, the blocks were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PBS for 1 hour at 4 °C and dehydrated with increasing concentration of ethanol. After complete dehydration, blocks were transferred into propylene oxide 2 times for 4 minutes. Following this, blocks were immersed in the mixture of propylene oxide and Durcupan resin (Sigma, St Louis, USA) for 30 minutes. Then, blocks were placed into Durcupan-containing aluminum-foil boats overnight, and embedded into gelatin capsule filled with Durcupan resin. After polymerization and hardening of the resin at 56 °C for 72 hours, 700 nm semi-thin sections were cut with Leica Ultracut ultramicrotome, mounted on glass slides, stained with toluidine-blue and examined with Olympus BX50 light microscope. Following this, 65 nm serial ultrathin sections were cut with the ultramicrotome, and mounted on mesh and single-slot copper grids. The ultrathin sections were then contrasted by uranyl acetate and lead citrate, and were examined in JEOL 1200EX-II electron microscope.

Immuno-electron microscopy. *In vitro* cultured morula stage mouse embryos were stained in droplet. The embryos were fixed in 4% formaldehyde buffered in PB for 20 minutes at room temperature. Following fixation, blocking of endogenous peroxidase was achieved by immersing the embryos in 1% hydrogen peroxide for 15 minutes, non-specific binding sites were blocked with 3% of bovine serum albumin for 40 minutes. Embryos were then reacted with 1:50 diluted rabbit anti-PIBF primary antibody²⁰ for 2 hours at room temperature. Polyclonal anti-PIBF antibody was generated in our laboratory by immunizing rabbits with the 48-kDa N-terminal part of the human recombinant PIBF. The IgG from immune sera was affinity purified on protein-A or protein-G columns (AP Hungary Ltd, Budapest, Hungary). The antibody titres were determined by ELISA using the recombinant PIBF protein as the antigen. An aliquot of the antibody was absorbed with the 48-kDa N terminal part of the recombinant PIBF to be used for testing the specificity of binding on Western blots²⁰. Binding of the primary antibody was detected with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:100) (Dako, Denmark) at room temperature for 1 hour. Peroxidase reaction was visualized using diaminobenzidine as chromogene. Following the immunoreaction, embryos were mixed in 3% agar solution ((Sigma, St Louis, USA). After agar was hardened, small blocks of approximately 1 mm³ were cut and fixed with 2.5% glutaraldehyde diluted in

PB overnight at 4 °C. Post-fixation with 1% osmium tetroxide, embedding and cutting of the blocks were performed as described above.

Binding of EVs to mouse spleen cells. Spleen cells of 16 weeks old female CD1 mice were prepared by mechanical separation and filtered through a 30 µm Filcon filters (BD Biosciences, San Jose, USA). Multicolor staining method was used for the detection of CD4+ Th and CD8+ Tc cells. All antibodies (APC conjugated anti-mouse CD4 cat No: 553051 Clone RM4-5 (RUO) 553051 or PeCy7 conjugated anti-mouse CD8 cat. No: 552877 Clone 53-6.7 (RUO) 552877) were purchased from BD Biosciences.

For visualization the phosphatidylserine receptor (PSR) on CD4+ and CD8+ cells, the cells were reacted with anti-phosphatidylserine receptor antibody (Sigma; Cat no: P1495) for 20 min at room temperature, and with FITC-labelled secondary antibody (anti-rabbit IgG; Sigma; dilution 1: 50 with antibody buffer) for 30 min at room temperature. FITC-labelled secondary antibody was used as negative control to distinguish non-specific background signal from specific antibody signal.

Extracellular vesicles (EV fraction = 12.5 K pellet) were sedimented from five pooled mouse embryo culture media at 12,500 g for 20 minutes at 16 °C (Z216 M K Microlite centrifuge, 200.88 rotor, Hermle Labortechnik) and subsequently washed at 12,500 g for 15 minutes at 16 °C. Separated EVs were labelled with freshly prepared PKH-26 fluorescent dye at a final concentration of 5 µM of PKH according to the instructions of the manufacturer (Sigma, St Louis, USA).

PKH-labelled EVs were incubated in a 96 well plate with 5×10^4 anti-CD4 and anti-CD8 labelled splenocytes in the presence of 4% BSA for 30 minutes at 4 °C (BSA was used to inhibit binding of excess PKH to the lymphocytes). Diluted PKH dye solution without EVs (mock-stained control) was used to assess non-specific (EV-independent) staining (supplementary Fig. 1). At the end of the incubation period, cells were washed with PBS and analysed by flow cytometry. Experiments and measurements were repeated six times in two parallels. Measurements were carried out using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA) on the day of the staining, collecting $2.5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ cells/tube. CellQuest-Pro software (Becton Dickinson, CA, USA) was used for analysis.

Inhibition of EV binding to lymphocytes. To investigate the mechanism of EV binding to the lymphocytes, we measured EV binding after reacting the exofacial phosphatidylserine (PS) of embryo-derived EVs by Annexin V, or masking the surface phosphatidylserine receptor (PSR) molecules of splenocytes with anti-PSR polyclonal antibody.

CD4 and CD8 labelled splenocytes were incubated with 1 µg/ml of polyclonal anti-phosphatidylserine receptor antibody (Sigma; Cat no: P1495) for 20 min, at room temperature.

PKH labelled embryo-derived EVs were incubated with 1 µl of Annexin V (Sony Biotechnology Inc) in Annexin binding buffer for 5 minutes at room temperature.

Embryo-derived (untreated, or Annexin V treated) EVs were incubated with untreated or anti-PSR-treated lymphocytes in PBS, 4% BSA for 30 minutes at 4 °C.

PKH fluorescence signal of CD4+ and CD8+ lymphocytes was detected.

Intracellular IL-10 staining of splenocytes. Five hundred thousand splenocytes were stimulated with embryo-derived EVs for 4 hours in the presence of the protein transport inhibitor brefeldin A (Sigma, St Louis, USA). Stimulated cells were washed and incubated in 50 µl of staining buffer (1% BSA/PBS) with a pre-titrated optimal concentration of allophycocyanin (APC)-conjugated rat anti-mouse CD4 (APC Rat Anti-Mouse CD4 Clone RM4-5 (RUO) 553051), and FITC-conjugated rat anti-mouse CD8 (PE-CyTM7 Rat Anti-Mouse CD8a Clone 53-6.7 (RUO) 552877) monoclonal antibodies (15–30 min, at room temperature) for identifying CD4+ and CD8+ lymphocytes.

Anti-CD4 and anti-CD8 labelled cells were fixed (4% paraformaldehyde solution for 10 minutes, at room temperature), permeabilized with 0.1% saponin and incubated in 50 µl of staining buffer (PBS containing 1% BSA) with a pre-titrated optimal concentration of phycoerythrin-conjugated anti-mouse IL-10 monoclonal antibody (PE Rat Anti-Mouse IL-10 Clone JES5-16E3 (RUO) 561060) for 15–30 min, at room temperature. The cells were washed twice in 2 ml of PBS, centrifuged for 5 min at 300 g, and fixed with 300 µl of 2% paraformaldehyde (Sigma, St Louis, USA). Stained cells were stored at 4 °C in dark before analysis. All fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies were purchased from BD Biosciences. Tests were carried out by measuring, 5×10^4 cells/tube, on the day of the staining. All the FACS data were analysed with CellQuestPro software (Becton Dickinson, CA, USA).

Statistics. The two-tailed Student's t-test was used for statistical evaluation of the data. Differences were considered significant if the *P* value was equal to or less than 0.05.

Results

Mouse embryos produce extracellular vesicles. Mouse embryo-derived extracellular vesicles contain PIBF.

Embryo-derived EVs in mouse embryo culture media were identified by their Annexin V binding capacity, using flow cytometry. Annexin V containing culture medium (without embryo) was used for measuring the non-specific fluorescence background (Fig. 1A in panel A). The number of Annexin V positive events was higher in embryo culture media (Fig. 1C,E in panel A), than in empty media (Fig. 1A in panel A). Annexin V positive EVs disappeared upon treatment of the samples with Triton-X (Fig. 1D,F in panel A), while the non-specific fluorescence background in empty medium was not sensitive to Triton-X dependent lysis (Fig. 1B in panel A). In further experiments the events sensitive to 0.1% Triton-X 100 were considered as EVs.

Analysis of 14 embryo culture media and 4 empty media revealed a significant difference ($p < 0.001$) in the number of Annexin V+ and TritonX-dependent lysis sensitive EVs between the two groups (Fig. 1 Panel B).

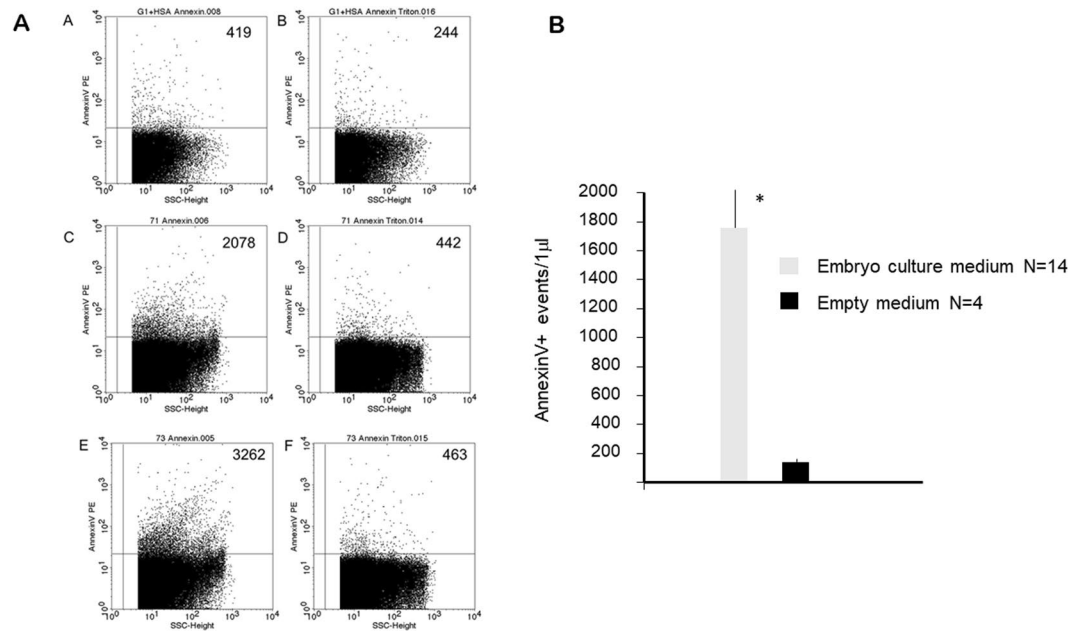


Figure 1. Extracellular vesicles in embryo culture media. EVs in mouse embryo culture media were identified by their Annexin V binding capacity, using flow cytometry. Annexin V containing empty medium was used for measuring the non-specific fluorescence background. The presence of EVs was confirmed by detergent lysis. **Panel A**; Annexin V positive EVs in two representative embryo culture media and an empty medium. **(A)** Annexin V positive EVs in empty medium. **(C,E)** Annexin V positive EVs embryo culture media. **(D,F)** Annexin V positive EVs disappear after TritonX treatment. **(B)** The background in empty medium is not sensitive to Triton X dependent lysis. Numbers in the upper right quadrants in panel A show the number of Annexin V+ events detected in a single measurement. **Panel B**; The number of Annexin V labelled Evs/ μ l in 14 individual embryo culture media and 4 empty media. The bars represent the mean \pm SEM of 14 and 4 experiments respectively * $p < 0.001$.

These data confirm, that that the cultured embryo produces detectable numbers of EVs, and Annexin V labelling is a reliable marker of embryo-derived EVs.

EVs with a diameter of 100 to 200 nm were also demonstrated at the foeto-maternal interface by transmission electron microscopy in day 5 murine pregnancy (Fig. 2A–C).

PIBF expression in embryo-derived EVs was demonstrated with immuno-electron microscopy (Fig. 2D).

Our earlier data show that mouse embryos express PIBF at all stages of development (supplementary Fig. 2).

Previous flow cytometric analysis in our laboratory confirmed the presence of PIBF+ EVs in embryo culture medium. Direct labelling of unfixed samples, detects the surface bound PIBF molecules, while a direct labelling of paraformaldehyde fixed samples detects the intra-vesicular PIBF.

Twenty mouse embryo culture media were analysed by multicolour flow cytometry. After fixation of these samples by 4% paraformaldehyde solution, the vesicles were reacted with FITC-labelled PIBF antibody and propidium iodide (PI) at the same time. The double labelling revealed the presence of 1) PIBF+/PI– vesicles; 2) PIBF+/PI+ and 3) PIBF–/PI+ vesicles, suggesting that not all vesicles contain PIBF (Supplementary Fig. 3).

Mouse embryo-derived extracellular vesicles bind to mouse spleen cells via phosphatidylserine.

Binding of EVs to mouse spleen cells was confirmed by flow cytometry.

In addition to the fluorescence signals, FS (forward scatter) and SS (side scatter) parameters were also detected. Based on their size (FS) and granularity (SS) cells were classified as lymphocytes and non-lymphoid cells and gated accordingly (Supplementary Fig. 4) Fluorescence of PKH-labeled EV samples as well as of mock-stained control samples were assessed within the “non-lymphoid” and within the “lymphocyte” gates.

Mouse embryo-derived EVs were found to adhere to the surface of both CD4+ and CD8+ T lymphocytes (Fig. 3A), but not to non-lymphoid cells (Fig. 3B).

For comparing the EV binding of CD4+ or CD8+ cells, we used the PKH fluorescence intensity parameter (geometric mean channel values/MFI values) which reflects on the number of bound EVs per cell. The mock control did not get any fluorescence signal at PKH wavelength. We defined CD4+ and CD8+ cells gates and compared the PKH fluorescence within the CD4+ and CD8+ lymphocyte gates. Significantly higher ($p < 0.001$) PKH fluorescence was detected in the CD8+ cells gate (MFI = 48.58 ± 6.19) than in the CD4+ cells gate (MFI = 10.81 ± 1.19), showing that CD8+ cells bound more embryo-derived EVs than CD4+ cells (Fig. 3C).

We hypothesized that EVs bind to the lymphocytes via an interaction between the membrane PS and the PSR on the surface of the cells.

Reacting CD4+ and CD8+ cells with anti-PSR antibody revealed an equal number of PSR/cell in the two subsets (Fig. 4)

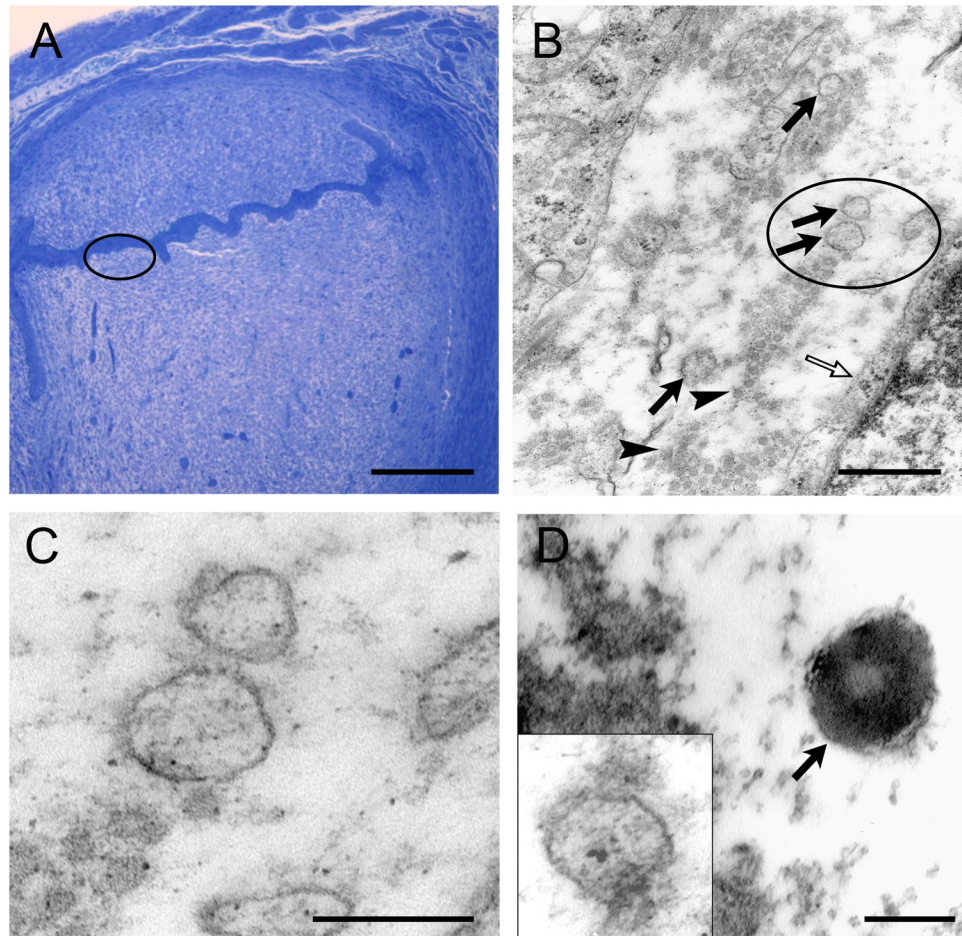


Figure 2. EVs at the feto-maternal interface and around *in vitro* cultured embryos. (A) Light microscopic photomicrograph showing implantation in a semi-thin section. Encircled area in A is shown with higher magnification in B. Scale bar = 200 μm . (B) Low magnification electron microscopic photomicrograph revealing EVs (arrows) at the embryo maternal interface. Open arrow point to the membrane of a maternal cell, while arrowheads indicate collagen fibres in the extracellular space. Encircled area in B is shown with higher magnification in C. Scale bar = 500 nm (C) High magnification of EVs at the embryo maternal interface. Scale bar = 200 nm. (D) *In vitro* cultured morula stage mouse embryos were immune-stained with rabbit anti- PIBF primary antibody, then embedded in agar and prepared for electron microscopy. The EV (indicated with an arrow) produced by the embryo is PIBF-immuno-reactive. Insert shows EV reacted with the secondary antibody only, as a negative control. Scale bar = 100 nm.

Therefore, we investigated the role of phosphatidylserine-phosphatidylserine receptor interaction in binding of embryo-derived EVs to T cells. Prior to incubating embryo-derived EVs with immune-phenotyped splenocytes, we masked the exofacial phosphatidylserine binding sites of embryo-derived EVs by AnnexinV, or the phosphatidylserine receptors on the lymphocytes by phosphatidylserine receptor specific monoclonal antibodies and checked the number of EV binding CD4⁺ and CD8⁺ cells. The binding of PKH-labelled embryo-derived EVs was partially inhibited in both cases (Fig. 5A). These experiments were repeated 4 times, and revealed a significant ($p = 0.05$) reduction in the number of EVs bound/cell following anti PSR or AnnexinV blocking (Fig. 5B). Therefore we concluded that PSR may be one of the target binding sites of embryo-derived EVs.

PIBF containing EVs alter IL-10 expression of mouse peripheral lymphocytes. Anti-CD4 or anti-CD8 labelled mouse spleen cells were incubated with embryo derived EVs, or with EVs that had been treated with anti-PIBF antibody for 30 mins at 37°C. Then the cells were labelled with anti- IL-10 antibody, and the number of IL-10 positive cells among the subpopulations was determined by flow cytometry.

The percentage of IL-10⁺ CD8⁺ cells increased in the presence of EVs, and this was counteracted by pre-treatment of EVs with an anti-PIBF antibody (Fig. 6). The presence of EVs did not alter IL-10 production in either CD4⁺ cells or of B cells (data not shown).

Discussion

Here we show that mouse embryos produce extracellular vesicles both in culture and after implantation. EVs can be produced by virtually all cell types, however it has been debated, whether a single embryo would be able to produce a detectable amount of EVs. The more so, because the culture medium contains serum or albumin,

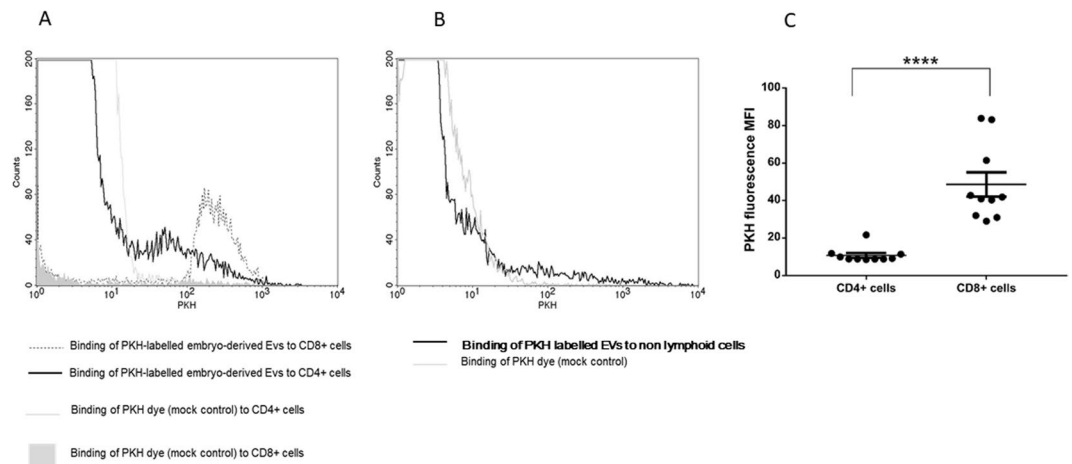


Figure 3. Binding of embryo-derived EVs to mouse peripheral lymphocytes. For comparing EV binding to different splenocytes including CD4+, CD8+, or „non-lymphoid” cells, PKH fluorescence intensity parameter (geometric mean channel values/MFI values) was used and overlay histograms were displayed. (A) Mock control inside CD8+ population is represented by a grey-filled histogram. Mock control inside CD4+ population is represented by the light grey line. EV binding to CD8+ cells is represented by unfilled grey dashed line. EV binding to CD4+ cells is represented by black line. (B) Mock control inside „non-lymphoid” population is represented by a grey histogram and EV binding is demonstrated by a dark line. (C) Significantly higher PKH fluorescence was detected within the CD8+ gate than in the CD4+ gate ($p < 0.0001$). The experiments were repeated 6 times in duplicates. Though it gave similar results, one of the experiments was excluded from this graph, because of the use of a different PKH dye. mean \pm SEM are shown.

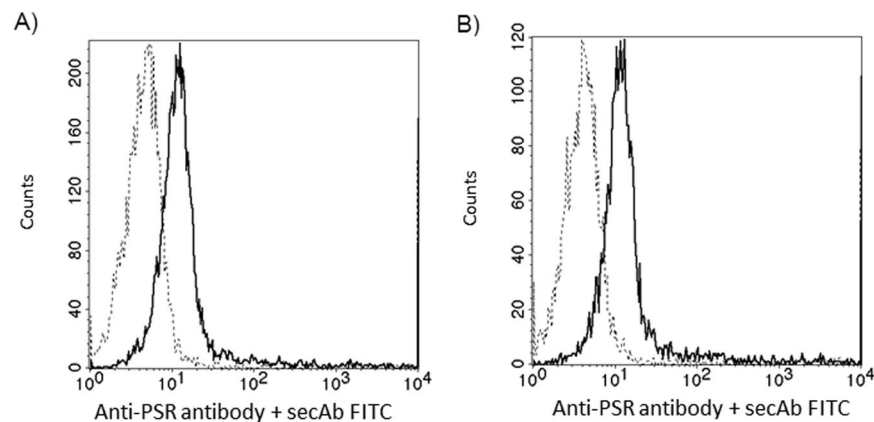


Figure 4. Phosphatidylserine receptor expression on CD4+ and CD8+ cells. Flow cytometry analysis of PSR expression on the cell surface of CD4+ (A) and CD8+ (B) T cells. Histograms show staining with unconjugated anti-PSR antibody followed by FITC-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG (solid lines). Control cells were stained with FITC-conjugated secondary antibody alone (dashed lines).

both of which could also be a source of EVs. Indeed, Tannetta *et al.*²¹, points out the difficulty of measuring EVs in embryo culture medium.

For embryo culture we used KSOM medium supplemented 0.4% bovine serum albumin. When EV content of spent and empty media were compared (Fig. 1), though there was definitely a background in the empty medium, this was not sensitive to TritonX-dependent lysis, which excludes the presence of EVs in the empty medium, thus the observations are very likely due to the presence of embryo-derived EVs.

This is in line with our earlier data, showing that nucleic acid containing EVs are present in day 5 human embryo culture media, and that the number of these EVs is related to embryo competence⁵. Recently, other groups have also reported on the presence of EVs in embryo culture medium. Giacomini *et al.*²², characterized HLA-G containing EVs isolated from conditioned media from *in vitro* cultured human embryos. EVs were demonstrated in the culture medium of bovine blastocyst and the characteristics of these EVs varied depending on embryo competence²³. Qi *et al.*²⁴, showed that the negative effects of culture media replacement during embryo culture are due to the loss of embryo derived EVs, and can be corrected by exosome supplementation.

We have shown that EVs bind to the lymphocytes and the binding is inhibited both by anti-phosphatidylserine receptor antibodies and by Annexin V. Interestingly, we found no significant EV binding to non-lymphoid cells.

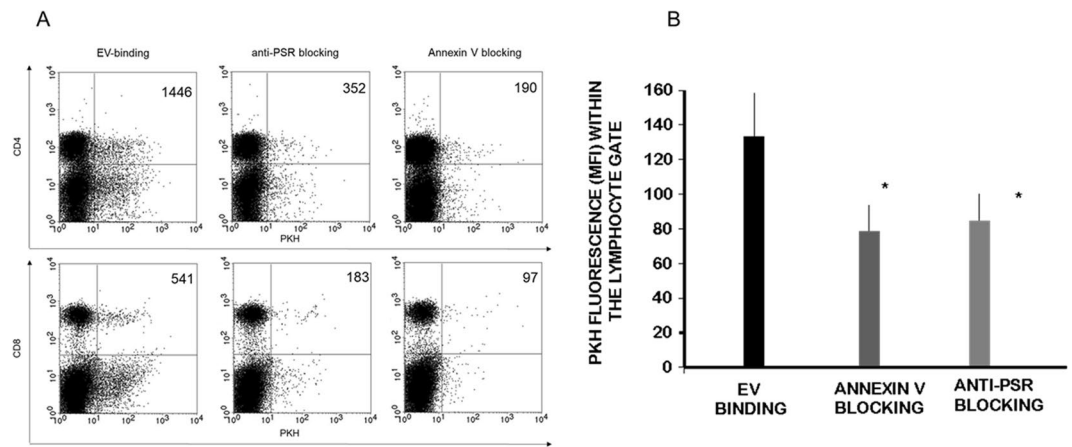


Figure 5. Blocking the exofacial phosphatidylserine binding sites of embryo-derived EVs inhibits the binding of EVs to the lymphocytes. Prior to incubating embryo-derived EVs with anti-CD4 and anti-CD8 labelled splenocytes, we masked phosphatidylserine on the membranes of EVs by AnnexinV, or the phosphatidylserine receptors on the lymphocytes and checked the number of EVs binding CD4+ and CD8+ cells. **Panel A:** The upper right quadrants of representative dot plots show the PKH+/CD4+ or PKH+ /CD8+ double positive cells. These populations represent the number of lymphocytes which bound PKH-labelled EVs on their surface. Both anti-PSR antibody pretreatment of lymphocytes, and blocking of the exofacial phosphatidylserine on embryo-derived EVs by Annexin V partially inhibited the binding of EVs. **Panel B:** For comparing EV binding of lymphocytes with or without blocking, we used the PKH fluorescence intensity parameter (geometric mean channel values/MFI values) which reflects on the number of EVs per cell. PKH fluorescence was measured in the lymphocyte gate. Significantly lower ($p = 0.05$) PKH fluorescence was detected both after anti-PSR antibody pretreatment and Annexin V blocking. The bars represent the mean \pm SEM of 4 experiments.

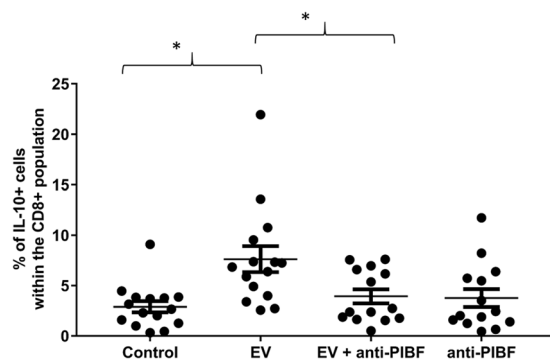


Figure 6. IL-10 expression of mouse peripheral CD8+ lymphocytes incubated with mouse embryo-derived EVs, or with anti-PIBF treated mouse embryo-derived EVs. Anti-CD8 labelled mouse spleen cells were incubated with embryo derived EVs, or with EVs that had been pre-treated with anti-PIBF antibody for 30 mins. Anti-rabbit IgG was used as an isotype control. Then the cells were labelled with anti-IL-10 antibody, and the number of IL-10 positive cells among the subpopulations was determined by flow cytometry. The bars represent the mean \pm SEM of 15 measurements. * $p < 0.001$.

This might be due to a lower phosphatidylserine receptor expression on these cells. However, the non-lymphoid population is a mixture of different cell types, and the phosphatidylserine receptor expression of each has not been tested.

Though CD4+ and CD8+ cells express similar numbers of phosphatidylserine receptor, CD8+ cells bound higher amounts of EVs than CD4+ lymphocytes, suggesting, that in addition to the PS-PSR binding, other, yet unidentified mechanisms might also be involved in binding of EVs to CD8+ cells.

EVs contain different kinds of molecules, including lipids, nucleic acids, peptides and proteins, and as such, they might act as vehicles transporting information from one cell to the other. EVs from both immune and non-immune cells might have important roles in immune regulation.

With immuno-electron microscopy we identified PIBF in embryo-derived EVs. PIBF mediates many of the immunological actions of progesterone during pregnancy. PIBF alters the arachidonic acid metabolism²⁵, inhibits NK activity^{26,27} and results in Th2-dominant cytokine production by maternal lymphocytes²⁸. Furthermore, owing to its immunological effects PIBF contributes to the maintenance of pregnancy. Higher rates of foetal loss were observed in mice treated with anti-PIBF compared to untreated controls²⁶, and recent data show that, PIBF+ decidual B cells are needed for the maintenance of late pregnancy²⁹.

We hypothesized that the intercellular communication between the embryo and the maternal immune system in the peri-implantation period might be established via EVs.

There is evidence for such a mechanism in more advanced pregnancy, as placental exosomes isolated from peripheral blood of pregnant women have been shown to suppress T-cell signalling³⁰. In the present study, murine embryo-derived EVs, increased the number of IL-10+ cells among peripheral CD8+ cells, but not in the CD4+ population. IL-10 producing CD8+ T cells might have a special function. Earlier studies revealed that IL-10 producing CD8+ T cells control influenza virus induced inflammation in the lung³¹, and that virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection³².

Pre-treatment of EVs with an anti-PIBF antibody abrogates the above effect of the EVs. These data suggest, that PIBF transported by the EVs from the embryo to maternal lymphocytes might induce increased IL-10 production by the latter, this way contributing to the Th2 dominant immune responses described during pregnancy. The finding is in line with our earlier data³³, showing increased IL-10 production of murine spleen cells in the presence of PIBF.

We show for the first time, that murine embryo derived EVs bind to peripheral lymphocytes –at least in part - via phosphatidylserine, and influence IL-10 production of CD8+ peripheral lymphocytes. The latter effect can at least partly be attributed to PIBF content of the EVs.

These data suggest, that PIBF transported by the EVs from the embryo to maternal lymphocytes might induce increased IL-10 production by the latter, this way contributing to the Th2 dominant immune responses described during pregnancy.

The above findings contribute to our understanding of the embryo-maternal communication in the peri-implantation period.

References

1. Daya, S. & Clark, D. A. Immunosuppressive factor (or factors) produced by human embryos *in vitro*. *N Engl. J Med* **24**, 1551–1552 (1986).
2. Kelemen, K., Paldi, A., Tinneberg, H., Torok, A. & Szekeres-Bartho, J. Early recognition of pregnancy by the maternal immune system. *Am J Reprod Immunol.* **39**, 351–5 (1998).
3. Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M. & Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 15–26 (2011).
4. Pallinger, E. *et al.* A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Sci Rep.* **6**, 39927 (2017).
5. Montecalvo, A. *et al.* Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. *J Immunol.* **180**, 3081–3090 (2008).
6. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
7. Nolte-’t Hoen, E. N., Buschow, S. I., Anderton, S. M., Stoorvogel, W. & Wauben, M. H. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood.* **113**, 1977–1981 (2009).
8. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med.* **4**, 594–600 (1998).
9. Admyre, C. *et al.* B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* **120**, 1418–1424 (2007).
10. Wakim, L. M. & Bevan, M. J. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature.* **471**, 629–632 (2011).
11. MacKenzie, A. *et al.* Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity.* **15**, 825–835 (2001).
12. Pizzirani, C. *et al.* Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood.* **109**, 3856–3864 (2007).
13. Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G. R. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* **179**, 1913–1925 (2007).
14. Xiang, X. *et al.* TLR2-mediated expansion of MDSCs is dependent on the source of tumor exosomes. *Am J Pathol.* **177**, 1606–1610 (2010).
15. Chalmers, F. *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* **120**, 457–471 (2010).
16. Liu, Y. *et al.* Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells. *Am J Pathol.* **176**, 2490–2499 (2010).
17. Szekeres-Bartho, J. & Polgar, B. PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor. *Am J Reprod Immunol* **64**, 77–86 (2010).
18. György, B. *et al.* Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood.* **117**, e39–48 (2011).
19. Osteikoetxea, X. *et al.* Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9775–82 (2015).
20. Polgár, B., Nagy, E., Mikó, E., Varga, P. & Szekeres-Barthó, J. Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod.* **71**, 1699–705 (2004).
21. Tannetta, D., Dragovic, R., Alyahyaie, Z. & Southcombe, J. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell Mol Immunol.* **11**, 548–63 (2014).
22. Giacomini, E. *et al.* Secretome of *in vitro* cultured human embryos contains extracellular vesicles that are uptaken by the maternal side. *Sci Rep.* **7**(1), 5210 (2017).
23. Mellisho, E. A. *et al.* Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced *in vitro*. *PLoS One.* **12**, e0178306 (2017).
24. Qu, P. *et al.* Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. *PLoS One.* **12**, e0174535 (2017).
25. Par, G., Geli, J., Kozma, N., Varga, P. & Szekeres-Bartho, J. Progesterone regulates IL-12 expression in pregnancy lymphocytes by inhibiting phospholipase A2. *Am. J. Reprod. Immunol.* **49**, 1–5 (2003).
26. Szekeres-Bartho, J., Par, G., Dombay, G., Smart, Y. C. & Volgyi, Z. The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell. Immunol.* **177**, 194–199 (1997).
27. Faust, Z., Laskarin, G., Rukavina, D. & Szekeres-Bartho, J. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **42**, 71–75 (1999).
28. Szereday, L., Varga, P. & Szekeres-Bartho, J. Cytokine production in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **38**, 418–422 (1997).
29. Huang, B. *et al.* Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat Med.* **23**, 128–135 (2017).

30. Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C. & Taylor, D. D. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol.* **56**, 345–55 (2006).
31. Sun, J., Madan, R., Karp, C. L. & Braciale, T. J. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nature Medicine* **15**, 277–284 (2009).
32. Abel, M. *et al.* Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* **44**, 1607–16 (2006).
33. Szekeres-Bartho, J. & Wegmann, T. G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol.* **31**, 81–95 (1996).

Acknowledgements

This work was supported by SROP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053 to J.S., SROP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0004 GINOP-2.3.2-15-201600021 to J.S., PTE ÁOK-KA 2015–12 and OTKA K125212.

Author Contributions

Eva Pallinger carried out flow cytometric determination of EVs and evaluated the data. Zoltan Bognar and Timea Csabai, and Agnes Bogdan obtained murine embryos and collected samples. Hajnalka Abraham performed electron microscopy. Julia Szekeres-Bartho designed the study, and critically evaluated the results.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23112-z>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018



Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice

Timea Csabaj^{1,2,3,4}, Eva Pallinger⁵, Arpad F. Kovacs⁵, Eva Miko⁶, Zoltan Bognar^{1,2,3,4} and Julia Szekeres-Bartho^{1,2,3,4*}

¹ Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary, ² János Szentágothai Research Centre, Pecs University, Pecs, Hungary, ³ Endocrine Studies, Centre of Excellence, Pecs University, Pecs, Hungary, ⁴ MTA-PTE Human Reproduction Research Group, Pecs, Hungary, ⁵ Department of Genetics, Cell, and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary, ⁶ Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Marie-Pierre Piccinni,
University of Florence, Italy

Reviewed by:

Gerard Chaouat,
INSERM U976 Immunologie,
Dermatologie, Oncologie, France
Surendra Sharma,
Women & Infants Hospital of Rhode
Island, United States

*Correspondence:

Julia Szekeres-Bartho
Szekeres.julia@pte.hu

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance and
Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 17 October 2019

Accepted: 13 February 2020

Published: 11 March 2020

Citation:

Csabaj T, Pallinger E, Kovacs AF,
Miko E, Bognar Z and
Szekeres-Bartho J (2020) Altered
Immune Response and Implantation
Failure in Progesterone-Induced
Blocking Factor-Deficient Mice.
Front. Immunol. 11:349.
doi: 10.3389/fimmu.2020.00349

Earlier data suggest that progesterone-induced blocking factor (PIBF) is involved in implantation. The present study therefore aims to investigate the consequences of functional PIBF deficiency during the peri-implantation period. CD1 female mice were injected intraperitoneally with 2 μ g anti-PIBF monoclonal antibody on days 1.5 and 4.5 of pregnancy. The number of implantation sites and resorption rates were recorded on day 10.5. PIBF+ decidual NK cells and B cells were detected by immunohistochemistry or immunofluorescence. Decidual and peripheral NK activity was assessed by flow cytometry. A prime PCR array was used for determining the differential expression of genes involved in lymphocyte activation and Th1 or Th2 differentiation in CD4+ and CD8+ spleen cells from pregnant anti-PIBF-treated and control mice. Anti-PIBF treatment in the peri-implantation period resulted in impaired implantation and increased resorption rates in later pregnancy. The number of PIBF+ decidual NK cells decreased, while both decidual and peripheral NK activity increased in the anti-PIBF-treated mice. B cells were absent from the resorbed deciduas of anti-PIBF-treated mice. The genes implicated in T cell activation were significantly downregulated in CD4+ and increased in CD8+ of the anti-PIBF-treated animals. The gene for IL-4 was significantly downregulated in CD4+ cells while that of IL-12A was upregulated in CD8+ cells of anti-PIBF-treated animals. These data suggest that the lack of PIBF results in an impaired T cell activation, together with Th1 differentiation and increased NK activity, resulting in implantation failure.

Keywords: PIBF, decidual NK cells, T cell activation, B cells, implantation

INTRODUCTION

The success of embryo implantation depends on embryo quality as well as on the receptivity of the maternal endometrium. The process starts with the attachment of the embryo to the endometrial epithelium (1–6), followed by invasion to the decidua. Progesterone plays a central role in this process (4, 6) via the nuclear progesterone receptor (PR) isoforms, PRA and PRB (7, 8). Studies on PR knockout mice revealed that PRA is required for endometrial receptivity and decidualization (9), and consequently, PRA-deficient mice are infertile (10, 11).

The progesterone-induced blocking factor (PIBF) is a progesterone-induced mediator which conveys some of the immunological effects of progesterone. The *Pibfl* gene contains a progesterone response element (12), which is activated following the engagement of PRA in the mouse uterus (13).

Earlier data suggest that PIBF is required for the establishment and maintenance of pregnancy, both in humans and mice. In the sera of pregnant women, PIBF concentrations increase throughout gestation and drop before labor (14). During spontaneous miscarriage or preterm delivery, serum PIBF concentrations fall below the normal levels (15). Anti-PIBF treatment or anti-progesterone treatment of pregnant mice results in increased resorption rates, together with an inversion of the Th1/Th2 cytokine balance (16). The latter is due to the fact that PIBF induces an increased synthesis of Th2 cytokines both *in vitro* (17) and *in vivo* (18). Recent data show that PIBF plays a role in implantation in mice (13).

The decidual transformation of endometrial stromal cells is a prerequisite for a successful implantation. Ablation of PRA but not PRB expression in mice results in a uterine phenotype similar to PRKO, indicating that PRA is the major isoform involved in the regulation of uterine receptivity and decidualization in the mouse (19). It is important to point out that, in humans, PRB is also involved in decidualization (20).

In our hands, during a 6-day culture, PIBF induced the decidual transformation of mouse endometrial stromal cells (13). Furthermore, in the mouse endometrium, PIBF expression significantly increased during the implantation window (13).

The immunological effects of PIBF play an important role in establishing a favorable immunological milieu for the developing fetus.

In spite of the presence of perforin and granzyme in their cytoplasmic granules, the decidual NK cells are weakly cytotoxic. High decidual NK activity might damage the fetus and result in a failed pregnancy. PIBF inhibits the degranulation of NK cells (21). Recently we demonstrated a high number of mouse decidual NK cells that contained PIBF in their cytoplasmic granules, suggesting that the local presence of PIBF might be a factor in the low decidual NK activity (22).

In the present study, we aimed to investigate the consequences of anti-PIBF treatment of pregnant mice during the peri-implantation period on reproductive performance as well as the underlying mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Treatment of Mice

Eight- to 12-week-old CD1 female mice (Charles River, Germany) were caged overnight with CD1 males in an environment controlled for temperature, humidity, and light. Sighting of the vaginal plug was considered as 0.5 day of pregnancy.

Females were injected intraperitoneally with 2 μ g of anti-PIBF monoclonal antibody (14) on days 1.5 and 4.5 of pregnancy. The control mice were injected with 100 μ l of PBS, among the same conditions. On day 10.5 of pregnancy, the mice were sacrificed, the number of implantation sites as well as resorption

rates was recorded, and spleens and deciduas were removed for lymphocyte isolation.

All procedures were approved by the Animal Care Committee of the University of Pécs.

Isolation of Decidual and Spleen Lymphocytes

Isolated mouse deciduas were minced with scissors and incubated for 30 min with 10 ml (1 mg/ml) of collagenase (collagenase from *Clostridium histolyticum*, type IV, Sigma-Aldrich, USA). The fragments were then passed through a 70- μ m mesh and washed with RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Scotland).

The pellet was resuspended in 10 ml of fetal calf serum (FCS)-free RPMI and filtered on a 40 μ m filter. The cell count was adjusted to 1×10^6 /ml in RPMI1640 (Gibco, Life technologies, Scotland) + 10% FCS (Gibco, Life Technologies, Scotland) + 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, Scotland).

Spleen cells were isolated by passing the spleen through a 100- μ m stainless steel mesh and centrifuging for 10 min at 1,000 rpm. The pellet was resuspended in 10 ml RPMI1640, filtered on a 70- μ m mesh and further on a 40- μ m mesh, washed, and resuspended in RPMI1640. The lymphocytes were isolated on Ficoll-Paque gradient, washed, and resuspended in RPMI1640 + 10% FCS + 1% penicillin/streptomycin.

Immunohistochemistry

The implantation sites were isolated on day 10.5 of pregnancy, fixed in 6% of buffered formalin, and then embedded in paraffin. Five-micrometer paraffin sections were deparaffinized, rehydrated, and revealed with DAKO Target Retrieval Solution (S1699, Dako, Denmark) at pH 6.0 in a microwave oven. Endogenous peroxidase activity was inhibited with 3% H₂O₂, and non-specific antibody binding was blocked with 3% BSA.

The slides were then reacted with 1:25 diluted biotinylated monoclonal anti-PIBF antibody produced in our laboratory (14) or biotinylated mouse IgG2a either for 1 h at room temperature or overnight at 4°C. After incubation, the slides were washed for 3–5 min and reacted with 1:100 diluted streptavidin-horseradish-peroxidase (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) for 30 min in a humidified chamber. The reaction was developed with diaminobenzidine (DAKO, Glostrup, Denmark). The nuclei were counterstained with hematoxylin (DAKO, Glostrup, Denmark) for 3 min, and the slides were mounted.

Fluorescent Staining

For visualizing of the B cells, the sections were reacted overnight at 4°C with 1:30 diluted rat anti-mouse B220 IgG conjugated with Alexa Fluor 647. The antibody was produced at the Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, and was provided by Dr. Peter Balogh. The anti-B220 IgG was purified from the supernatant of rat hybridoma RA3-6B2 (obtained from ATCC) using Protein G affinity chromatography. The purified antibody was dialyzed into 0.1 M NaHCO₃ buffer and conjugated with Alexa Fluor 647 NHS dye (ThermoFisher Scientific) as recommended by the vendor. The

conjugated immunoglobulin was separated using Sephadex-G25 size exclusion chromatography.

For identifying of PIBF-positive decidual B cells, the sections were reacted overnight at 4°C with 1:25 diluted FITC-conjugated anti-mouse PIBF antibody, together with the 1:30 diluted Alexa647-conjugated anti-mouse B220. The nuclei were stained with Hoechst33342 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) for 5 min, washed, and then mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom) and examined with an Olympus FV-1000 laser scanning confocal system.

NK Cytotoxicity Test

A flow cytometric assay was used for the determination of the cytotoxic activity of peripheral and decidual natural killer cells from the control and the anti-PIBF-treated pregnant mice. The assay is based on the quantitative and the qualitative flow cytometric analysis of cell damage on a single-cell level. The mouse lymphoma cell line YAC-1 was used as the target cell population. The target cells were pre-stained with PKH-67 (PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Midi Kit for General Cell Membrane Labeling, Sigma- Aldrich, USA), a lipophilic dye that stably integrates into the cell membrane without disturbing its surface marker expression. It, thus, permits the distinction between target and effector cells. Freshly isolated peripheral and decidual lymphocytes from pregnant mice served as the effector cells. The target cells and the lymphocytes, at a ratio of 1:12.5, were centrifuged and incubated in RPMI1640 containing 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin medium for 4 h at 37°C and in 5% CO₂. After incubation, the cell mixture was centrifuged and stained with propidium iodide [PI, 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA)]. PI staining allows the discrimination between death and living target cells. Data analysis is performed first by gating on PKH-67-positive target cells, followed by the analysis of the PI-positive subpopulation killed (gating strategy is shown in **Figure 1**). The percentage of cytotoxicity in the PKH-67-gated cell population was calculated by subtracting unspecific PI+ positive target cells (spontaneous cell death), measured in appropriate controls without effector cells from the experimental samples. Flow cytometric analysis was performed

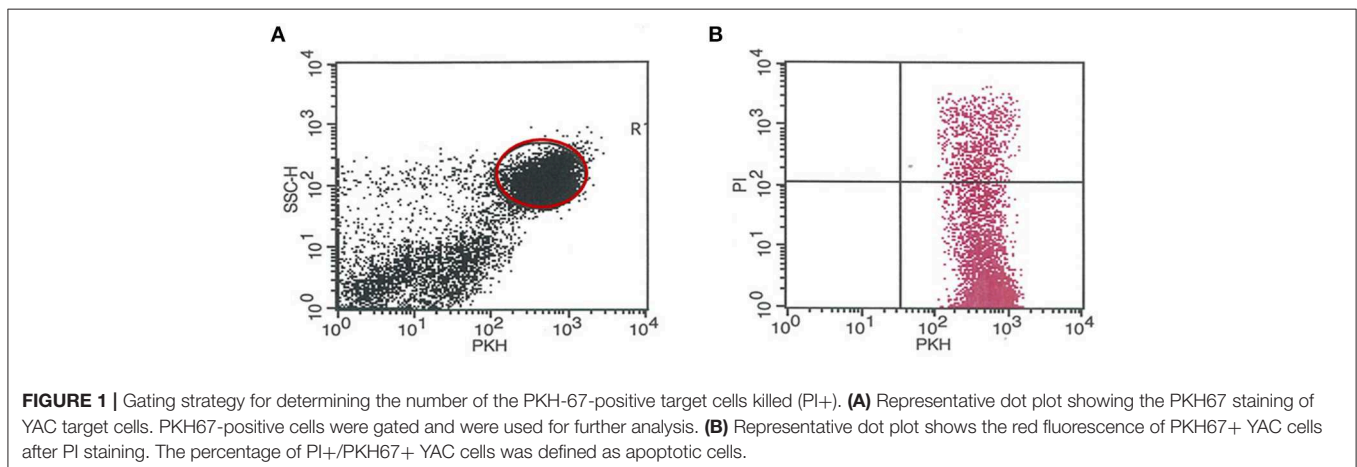
on a FACS Calibur flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) equipped with the CellQuest software program (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) for data acquisition and analysis.

Lymphocyte Activation and Th1 and Th2 Cell Differentiation

A prime PCR array from Bio-Rad was used for determining the markers for T cell activation and Th1 or Th2 differentiation in separated CD4+ and CD8+ spleen cells from anti-PIBF-treated and control pregnant mice. The mice were sacrificed on day 10.5 of pregnancy. The spleens were minced with scissors and passed through a 70-µm cell strainer. The CD4+ and CD8+ T cells were separated from splenic single-cell suspension by magnetic separation with the Mini-MACS system (Miltenyi Biotec Biotechnology Company, USA). Mouse Naive CD8a+ T Cell Isolation Kit (130-096-543) and mouse CD4+ T Cell Isolation Kit (130-104-454) were applied for negative selection, according to the manufacturer's instructions. The collected cells were washed, and the cell count was adjusted to 5×10^6 . One hundred thousand separated cells were fluorescently stained with the anti-mouse CD4 or anti-mouse CD8 monoclonal antibodies for checking of the separation efficiency. Cell debris and dead cells were excluded from the analysis based on scatter signals and propidium iodide fluorescence. For the stabilization of RNA, separated CD4+ or CD8+ splenocytes were stored frozen in RNAlater[®]-ICE solution. Total RNA was extracted from the cells with the Qiagen RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74104) according to the supplier's protocol. The RNA content of samples was measured with Qubit 4 Fluorometer using the Qubit RNA HS Assay Kit. The expression of 41 genes was determined using a Bio-Rad prime PCR array (Immune response-Th1 and Th2 cell differentiation M384; Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA). Quantitative PCR reactions were carried out on an ABI 7900 real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Data were analyzed by the Mann–Whitney *U* test and Student's *t* test. $P \leq 0.05$ was considered as significant.



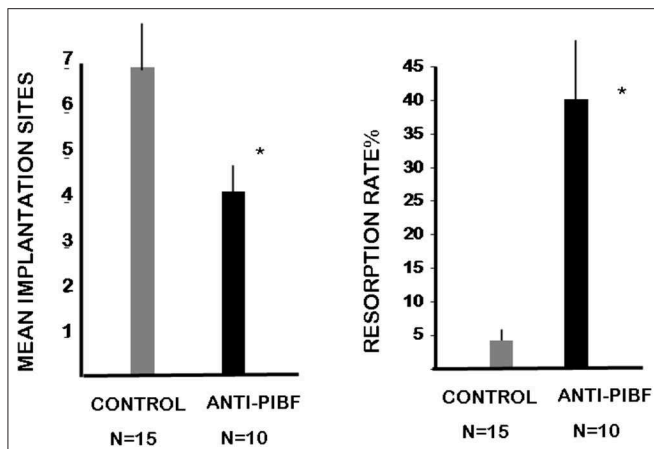


FIGURE 2 | Anti-PIBF treatment of pregnant mice in the peri-implantation period results in decreased implantation and increased resorption rates. CD1 mice were injected with anti-PIBF monoclonal antibody at days 1.5 and 4.5 of pregnancy. The controls were treated with PBS, among the same conditions. The number of implantation sites (1st panel) and resorption rates (2nd panel) were recorded on day 10.5. The implantation sites were significantly lower, while the resorption rates significantly increased in the anti-PIBF-treated mice. The columns represent the mean \pm SEM of the results from 10 (anti-PIBF-treated) and 15 (control) mice. * $P < 0.05$.

RESULTS

Anti-PIBF Treatment in the Peri-Implantation Period Results in Impaired Implantation and Increased Resorption Rates in Later Pregnancy

The mice were treated with anti-PIBF antibody at days 1.5 and 4.5 of pregnancy to render them functionally PIBF deficient during the implantation window. The mice were sacrificed at day 10.5. This enabled us to record not only the implantation sites but also the resorption rate among the implanted embryos. While the average number of implanted embryos was 6.5 in the controls, in females treated with anti-PIBF antibody in the peri-implantation period, the mean implantation sites decreased to four (Figure 2). The unusually low 2% resorption rate in the control group increased to 40% in the functionally PIBF-deficient mice (Figure 2).

PIBF+ Large Granulated Cells Are Depleted From the Deciduas of Anti-PIBF-Treated Mice

In an earlier study, we demonstrated a high number of large granulated cells—with a strong PIBF reactivity in the cytoplasmic granules—in the deciduas of day 12.5 pregnant mice. These cells were identified as members of the PAS+ DBA+ uterine NK cell population. PIBF co-localized with perforin in the cytoplasmic granules of the cells (22).

In the present study, we found a significantly decreased number of PIBF+ NK cells in the day 10.5 deciduas of resorbed embryos from anti-PIBF-treated mice compared to normal

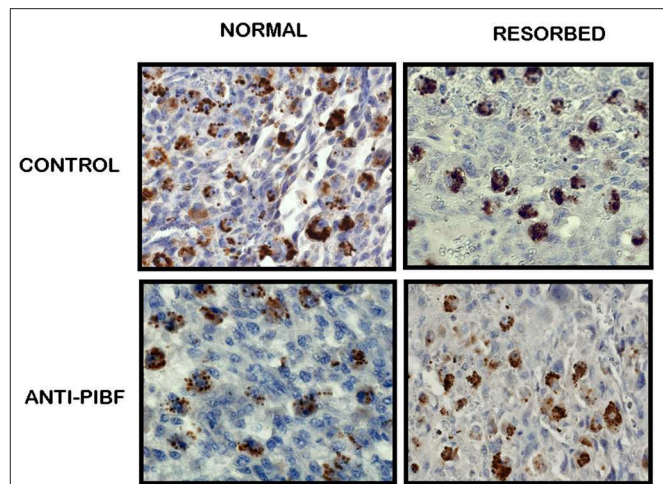


FIGURE 3 | Immunohistochemical analysis of PIBF+ NK cells in normal and resorbed deciduas from anti-PIBF-treated and control mice on day 10.5 of pregnancy ($\times 400$).

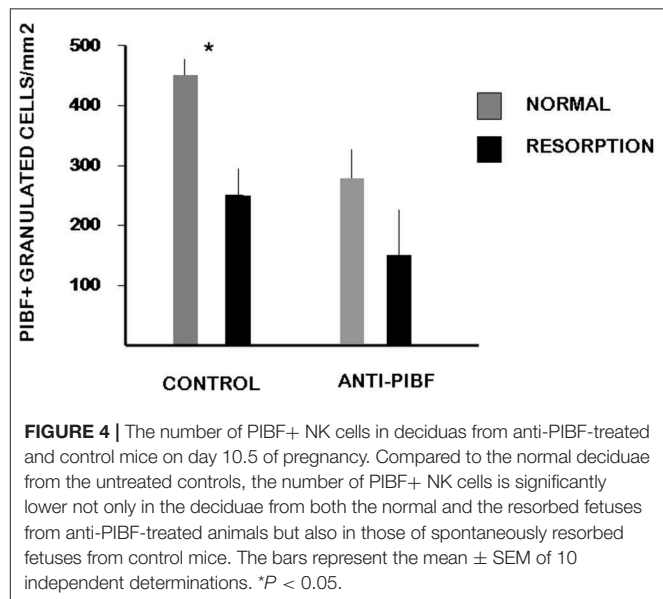


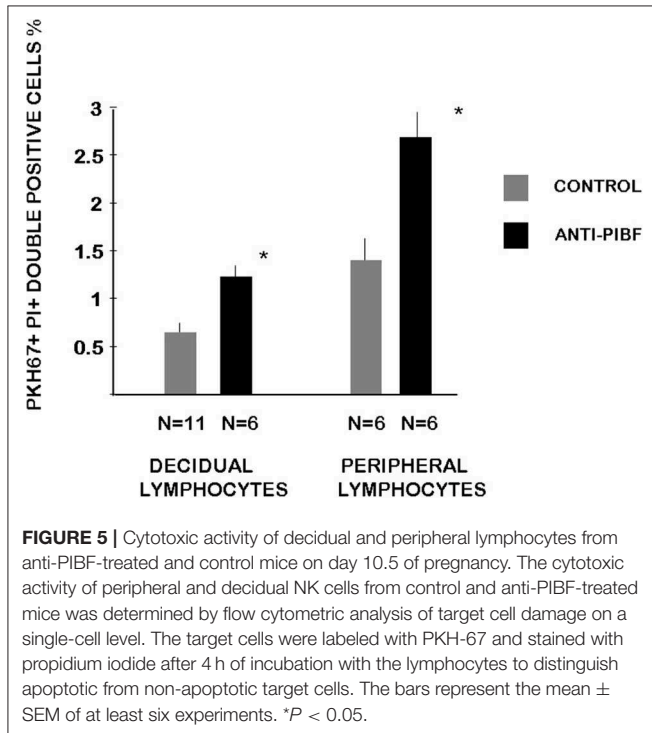
FIGURE 4 | The number of PIBF+ NK cells in deciduas from anti-PIBF-treated and control mice on day 10.5 of pregnancy. Compared to the normal deciduas from the untreated controls, the number of PIBF+ NK cells is significantly lower not only in the deciduas from both the normal and the resorbed fetuses from anti-PIBF-treated animals but also in those of spontaneously resorbed fetuses from control mice. The bars represent the mean \pm SEM of 10 independent determinations. * $P < 0.05$.

deciduas from untreated mice (Figures 3, 4). The number of PIBF+ granulated cells was also significantly lower in the deciduas of normal embryos from the anti-PIBF-treated mice and in those of spontaneously resorbed embryos from untreated control mice (Figures 3, 4) than in the normal decidua of the untreated mice. These data suggest that the decreased number of PIBF+ decidual lymphocytes was associated with resorption rather than with the lack of functional PIBF.

Cytotoxic Activity of Decidual and Peripheral NK Cells From Anti-PIBF-Treated and Control Mice

We determined the cytotoxic activity of decidual lymphocytes and of spleen cells from anti-PIBF-treated and control mice using a flow cytometric method. Both the decidual and the

peripheral NK activity of the anti-PIBF-treated mice were significantly ($P < 0.05$) increased compared to those of the controls (Figure 5).



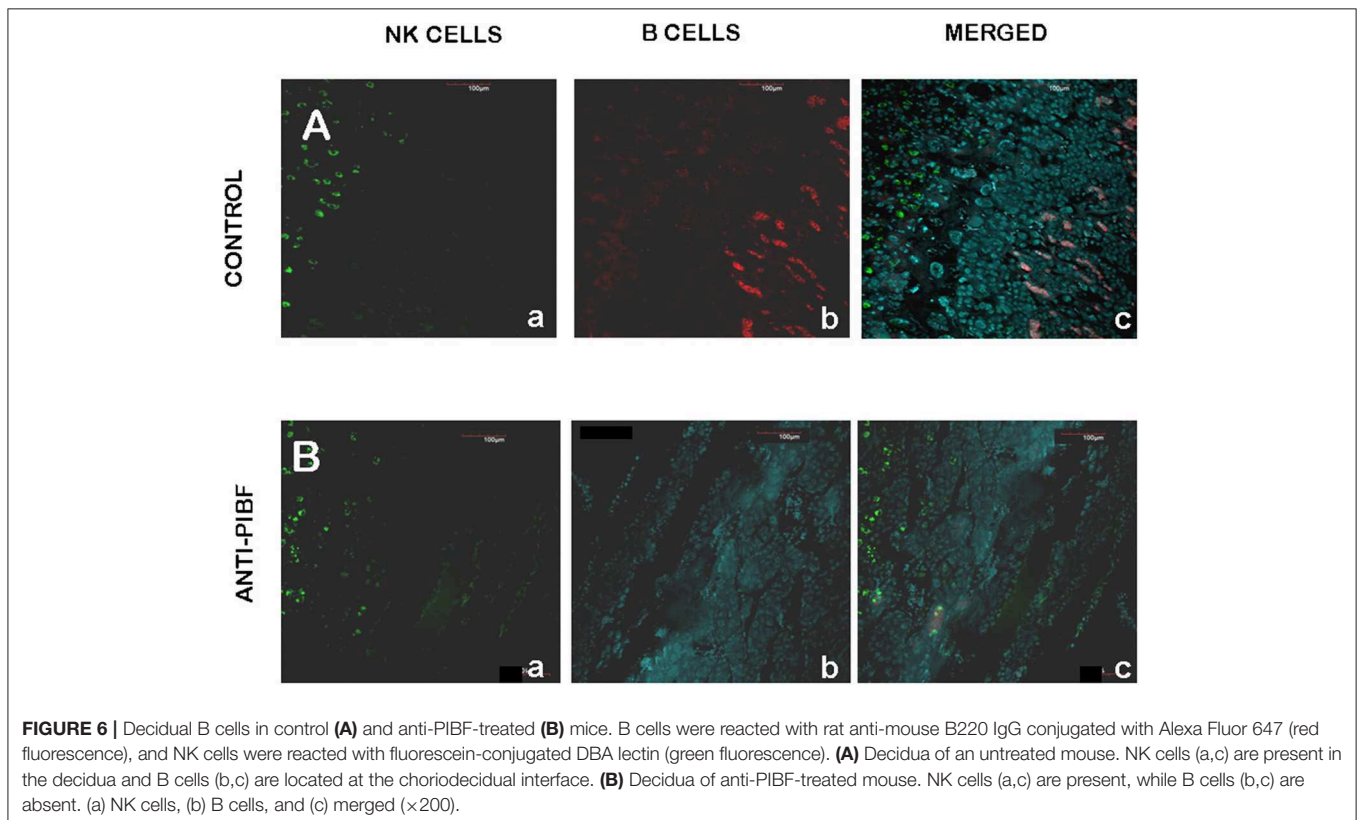
B Cells Are Depleted From the Deciduas of Anti-PIBF-Treated Embryos

The endometria of the control animals (Figure 6A) contained decidual NK cells (Figure 6A—a,c) and a discrete layer of B cells (Figure 6A—b,c) at the coriodecidual interface. While the NK cells were still present (Figure 6B—a,c), the B cells disappeared from the deciduas of the resorbed embryos from the anti-PIBF-treated mice (Figure 6B—b,c).

Functional PIBF Deficiency in the Peri-Implantation Period Results in Impaired CD4+ T Cell Activation and Th1 Type Differentiation

Peripheral Th cell subsets from anti-PIBF-treated and control mice were tested for the differential expression of 48 genes using a prime PCR array. Twelve of these showed a significantly higher or lower expression in the lymphocytes of anti-PIBF-treated mice compared to the controls. When analyzing the results, the differentially expressed genes were assigned to the following groups: (1) genes involved in T cell activation, (2) those involved in Th1 differentiation, and (3) those involved in Th2 differentiation.

The genes implicated in T cell activation, e.g., members of the CD3 complex (CD 247, CS3D, CS3E, CS3G, and IL2RG), were significantly downregulated in the CD4+ spleen cells of anti-PIBF-treated mice but significantly increased in the CD8+ cells of the same animals (Figure 7). In the anti-PIBF-treated mice, the beta chain of the IL2R was downregulated in the



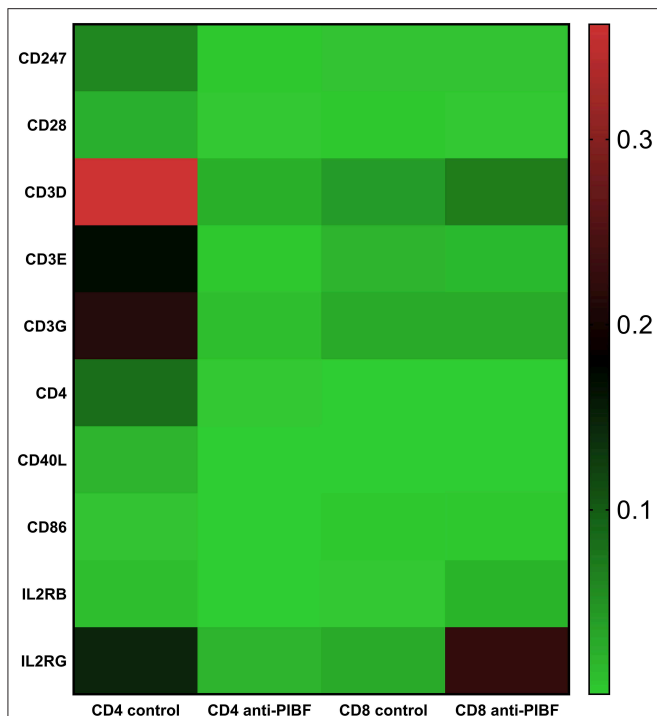


FIGURE 7 | Differential expression of genes implicated in T cell activation in splenic CD4+ and CD8+ T spleen cells of anti-PIBF-treated mice and controls. Heatmap of the T cell activation-related mRNA expression of genes in CD4+ and CD8+ splenocytes of anti-PIBF-treated and control mice. Clear separations are seen between the anti-PIBF-treated and control animals and also between the CD4+ and CD8+ cell types. Members of the CD3 complex and co-stimulatory molecules were downregulated in CD4+ cells and upregulated in CD8+ cells of anti-PIBF-treated mice. All of the results shown were significantly ($P < 0.05$) different from the values of the controls. The expression intensities were scaled on rows (genes) to Z scores to make them weigh equally in the clustering. The colors of the heatmap are mapped linearly to the Z scores (low expression in green and high expression in red).

CD4+ population, while in the CD8 population the alpha and the gamma chain of the IL2R and the IL2 increased. The genes of the co-stimulatory molecules were altered in a similar fashion. Upon anti-PIBF treatment, the genes for CD4, CD28, CD40L, and CD86 were downregulated in the CD4 and upregulated in the CD8 population (Figure 7). These data suggest that the absence of PIBF inhibits the activation of CD4+ cells and facilitates that of CD8+ T cells.

Among genes involved in the Th1/Th2 pathway, IL-4 was significantly downregulated in CD4+ cells of the anti-PIBF-treated mice. At the same time, IL-12 was upregulated in CD8+ cells of the anti-PIBF-treated animals (Figure 8).

DISCUSSION

Earlier we showed that PIBF induces the decidual transformation of mouse endometrial stromal cells. Furthermore, PIBF expression in the mouse endometrium is markedly increased during the implantation window (13). These data suggest

that PIBF might play an active role in implantation. To confirm this hypothesis, we neutralized the biological activity of PIBF during the peri-implantation period in mice and investigated the consequences of functional PIBF deficiency at several levels.

The anti-PIBF treatment of pregnant mice at days 1.5 and 4.5 of pregnancy resulted in a significantly reduced number of the implantation sites, and the implantations that took place nevertheless must have been compromised as shown by the high resorption rates. In an earlier study, anti-PIBF treatment on day 8.5 of pregnancy increased the resorption rate to 40% (23). The present data show that when administered in the peri-implantation period, the anti-PIBF antibody also interferes with implantation.

Several cell types, e.g., the peripheral pregnancy lymphocytes (24), the embryo itself (25), the trophoblast (26), and the endometrial cells (13), produce PIBF. In confirmed clinical pregnancies, PIBF is detectable in the serum of IVF patients 14 days after embryo transfer (Hudic et al., manuscript in preparation). A single embryo cannot produce such a high amount of PIBF. It is more likely that the bulk of the PIBF is produced by the maternal side in response to the presence of the embryo.

We further investigated the underlying mechanisms of implantation failure and pregnancy loss in functionally PIBF-deficient mice.

Failed pregnancies are characterized by high peripheral NK activity, both in humans and in mice (27–35).

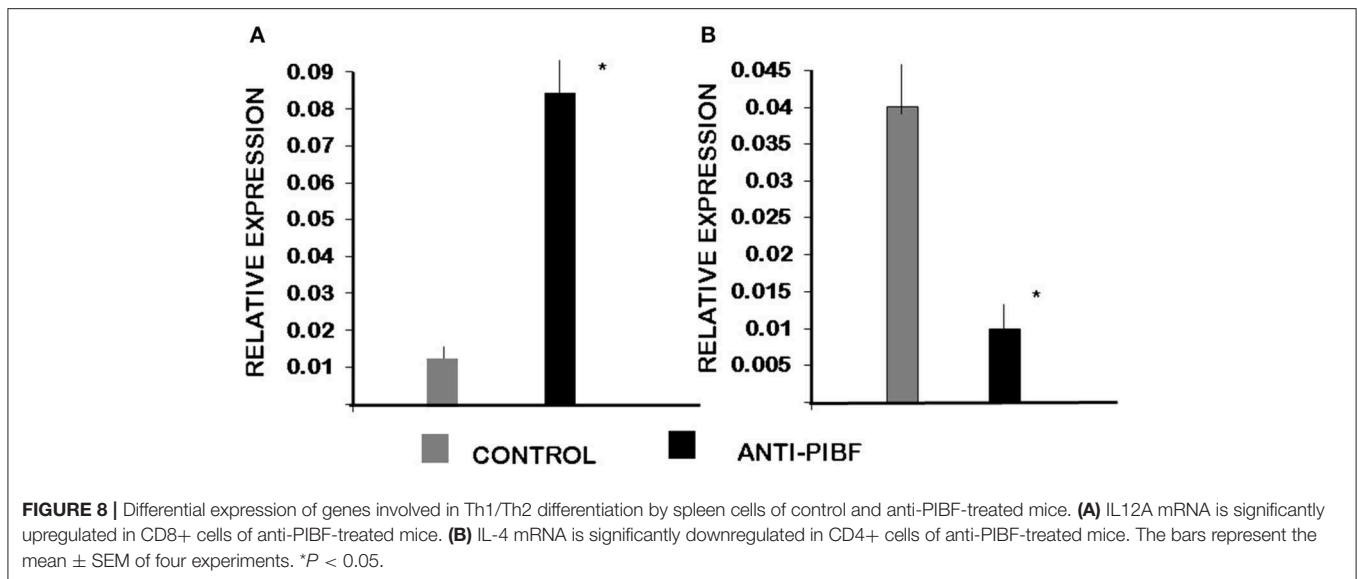
Progesterone decreases the NK activity of peripheral pregnancy lymphocytes in a concentration-dependent fashion (36), and RU 486 (a progesterone receptor antagonist) significantly augments the NK cell cytolytic activity *in vitro* (37).

Decidual NK cells constitute 60% of decidual lymphocytes (38). In spite of the availability of perforin and granzyme in their cytotoxic granules (38), these cells have a very moderate cytotoxic potential (39, 40) but secrete angiogenic factors and cytokines (38). The dynamics of the appearance of uterine NK cells suggests that one of their functions might be the control of placentation.

The low cytotoxic activity of decidual NK cells might be due to the presence of PIBF in their cytoplasmic granules (22). PIBF blocks the upregulation of perforin expression in activated decidual lymphocytes and inhibits NK cell cytotoxicity by blocking granule exocytosis (21, 41). Bogdan et al. (22) demonstrated a high number of PIBF+ NK cells in the day 12.5 decidua of pregnant mice.

Here we show that anti-PIBF treatment during the peri-implantation period results in the reduced presence of PIBF+ NK cells in the day 10.5 decidua, together with significantly increased decidual and peripheral NK activity, compared to the controls.

Anti-PIBF treatment of mid-pregnant mice has been shown to boost both the peripheral NK activity and the resorption rates. Increased resorption rates in anti-PIBF-treated mice were corrected by simultaneous treatment of the mice with anti-NK antibodies (23), suggesting that PIBF prevents pregnancy loss in mice—at least partly—by blocking NK activity. Increased decidual NK activity owing to the loss of PIBF+ decidual NK cells



could be one of the reasons for the increased resorption rates in the anti-PIBF treated mice.

B cells constitute a minor population among decidual lymphocytes, yet they might be important for the immunological balance of the decidua. A recent study showed that the IL-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor both in humans and in mice (42).

In the present study, we detected a distinct layer of B cells at the choriodecidual interface of control pregnant mice on day 10.5 of pregnancy. These cells were completely absent from the decidua of mice that had been treated with anti-PIBF during the peri-implantation period. We could not detect PIBF in the B cells on day 10.5 of pregnancy; however, PIBF+ B cells were present in the late pregnancy decidua of the control mice (data not shown).

Taken together, it is conceivable that anti-PIBF treatment—by depleting decidual B cells—will, at a later stage, put pregnancy at risk due to the lack of PIBF-positive B cells (42).

Finally, we performed a gene array on the spleen cells of anti-PIBF-treated and control mice in order to investigate whether the absence of functional PIBF had an effect on T cell activation and differentiation.

The T cell receptor is a complex of T cell receptor alpha and beta chains and the CD3 proteins. Activation of CD4+ T cells occurs through the simultaneous engagement of the T cell receptor and a co-stimulatory molecule on the T cell by the MHCII peptide and the co-stimulatory molecules on the APC. In the absence of co-stimulation, T cell receptor signaling results in anergy.

In addition to TCR alpha/beta, a whole set of cell surface receptors are also engaged by their ligands on APCs, which regulate Th differentiation. CD4 acts as a cellular adhesion molecule that binds MHC class II and stabilizes the interaction of T cells and APCs (43, 44). CD28 is a costimulatory receptor on T cells, which binds CD80 and CD86 on activated APCs (45). The TCR alpha/beta/CD3 complex provides the first signal

and CD28 the second signal for T cell activation. Both signals are required for IL-2 production and T cell proliferation. CD40 ligand, expressed by activated T cells, binds to CD40 on APCs, initiating a T cell-mediated immune response (46).

In this study, we found that members of the T cell receptor CD3 complex were significantly downregulated on CD4+ T cells of anti-PIBF-treated mice, while CD3D and IL2R B and G were upregulated in CD8+ cells, suggesting that Th cell activation is severely inhibited in the anti-PIBF-treated pregnant mice.

IL-4 is the main cytokine driving Th2 cell differentiation. IL-4 is produced by various cell types, including mast cells, basophils, eosinophils, NK cells, activated CD4+ T cells, and differentiated Th2 cells (47).

Here we found that the gene for IL-4 was significantly downregulated in CD4+ cells, while that of IL-12A was upregulated in CD8+ cells of the anti-PIBF-treated mice.

There is now ample evidence that the recognition of paternal antigens by the maternal immune system is not simply harmless but absolutely necessary for the setting in of the mechanisms that adapt the immune response to tolerate the fetus (48). Following recognition of fetal antigens, the immune system becomes activated, and this will result in the establishment of regulatory mechanisms, e.g., a Th2 dominant immune response (49, 50).

Neutralizing PIBF in the peri-implantation period abolishes this mechanism right at the start. CD4+ T cell activation is disturbed, T cells differentiate in the Th1 direction, and as a result, implantation as well as ongoing pregnancies is compromised.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care Committee of the University of Pecs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TC performed most of the work. EP and AK did the prime pcr. EM was responsible for the flow cytometry. ZB helped with the

animal experiments. This study was designed and supervised by JS-B.

FUNDING

This work was supported by GINOP-2.3.2-15-201600021, ÁOK KA Research Grants (KA 2017-22 and KA-2018-07), EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, and OTKA K125212.

REFERENCES

- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, et al. Embryo implantation. *Dev Biol.* (2000) 223:217–37. doi: 10.1006/dbio.2000.9767
- Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. *Front Biosci.* (2011) 3:745–67. doi: 10.2741/s184
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* (2004) 25:341–73. doi: 10.1210/er.2003-0020
- Pawar S, Hantak AM, Bagchi IC, Bagchi MK. Steroid-regulated paracrine mechanisms controlling implantation. *Mol Endocrinol.* (2014) 28:1408–22. doi: 10.1210/me.2014-1074
- Ramathal, C.Y, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med.* (2010) 28:17–26. doi: 10.1055/s-0029-1242989
- Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* (2012) 18:1754–67. doi: 10.1038/nm.3012
- Li X, Lonard DM, O'Malley BW. A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mech Ageing Dev.* (2004) 125:669–78. doi: 10.1016/j.mad.2004.04.007
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.* (2004) 128:139–46. doi: 10.1530/rep.1.00189
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes, A. R, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* (1995) 9:2266–78. doi: 10.1101/gad.9.18.2266
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science.* (2000) 289:1751–4. doi: 10.1126/science.289.5485.1751
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2003) 100:9744–9. doi: 10.1073/pnas.1732707100
- Rubel CA, Lanz RB, Kommagani R, Franco HL, Lydon JP, DeMayo FJ. Research resource: genome-wide profiling of progesterone receptor binding in the mouse uterus. *Mol Endocrinol.* (2012) 26:1428–42. doi: 10.1210/me.2011-1355
- Mulac-Jericevic B, Šučurović S, Gulic T, Szekeres-Bartho J. The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the mouse endometrium. *Am J Reprod Immunol.* (2019) 81:e13104. doi: 10.1111/aji.13104
- Polgár B, Nagy E, Mikó E, Varga P, Szekeres-Barthó J. Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod.* (2004) 71:1699–705. doi: 10.1095/biolreprod.104.030437
- Hudić I, Szekeres-Bartho J, Stray-Pedersen B, Fatušić Z, Polgar B, Ećim-Zlojutro V. Lower urinary and serum progesterone-induced blocking factor in women with preterm birth. *J Reprod Immunol.* (2016) 117:66–9. doi: 10.1016/j.jri.2016.07.003
- Szekeres-Bartho J, Par G, Szereday L, Smart CY, Achatz I. Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* (1997) 38:176–82. doi: 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00295.x
- Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol.* (1996) 31:81–95. doi: 10.1016/0165-0378(96)00964-3
- Kalinka J, Szekeres-Bartho J. The impact of dydrogesterone supplementation on hormonal profile and progesterone-induced blocking factor concentrations in women with threatened abortion. *Am J Reprod Immunol.* (2005) 53:166–71. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00261.x
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP, De Mayo FJ. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol.* (2001) 179:97–103. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00465-8
- Kaya HS, Hantak AM, Stubbs LJ, Taylor RN, Bagchi IC, Bagchi MK. Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization. *Mol Endocrinol.* (2015) 29:882–95. doi: 10.1210/me.2014-1363
- Faust Z, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am J Reprod Immunol.* (1999) 42:71–5. doi: 10.1111/j.1600-0897.1999.tb00468.x
- Bogdan A, Berta G, Szekeres-Bartho J. PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *J Reprod Immunol.* (2017) 119:38–43. doi: 10.1016/j.jri.2016.12.001
- Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay Gy, Smart YC, Volgyi Z. The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol.* (1997) 177:194–9. doi: 10.1006/cimm.1997.1090
- Szekeres-Bartho J, Faust Z, Varga P. The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes. *Am J Reprod Immunol.* (1995) 34:342–8. doi: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb00962.x
- Pallinger E, Bognar Z, Bogdan A, Csabai T, Abraham H, Szekeres-Bartho J. PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells. *Sci Rep.* (2018) 8:4662. doi: 10.1038/s41598-018-23112-z
- Anderle C1, Hammer A, Polgár B, Hartmann M, Wintersteiger R, Blaschitz A, et al. Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *J Reprod Immunol.* (2008) 79:26–36. doi: 10.1016/j.jri.2008.06.002
- De Fougères R, Baines M. Modulation of natural killer activity influences resorption rates in CBAXDBA/2 matings. *J Reprod Immunol.* (1987) 11:147–53. doi: 10.1016/0165-0378(87)90018-0
- Kinsky, R, Delage G, Rosin N, Thang MN, Hoffmann M, Chauat G. A murine model for NK mediated resorption. *Am J Reprod Immunol.* (1990) 23:73–5. doi: 10.1111/j.1600-0897.1990.tb00675.x
- Aoki K, Kajiuura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet.* (1995) 345:1340–2. doi: 10.1016/S0140-6736(95)92539-2
- Fukui K, Yoshimoto I, Matsubara K, Hori R, Ochi H, Ito M. Leukocyte function-associated antigen-1 expression on decidual natural killer cells in patients with early pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* (1999) 5:1083–8. doi: 10.1093/molehr/5.11.1083
- Ntrivalas EI, Kwak-Kim JYH, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, et al. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Human Reprod.* (2001) 16:855–61 doi: 10.1093/humrep/16.5.855
- Ntrivalas EI, Bowser CR, Kwak-Kim J, Beaman KD, Gilman-Sachs A. Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. *Am J Reprod Immunol.* (2005) 53:215–21. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00268.x
- Putowski L, Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Oleszczuk J, Jakowicki J. The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure

- (preliminary study). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* (2004) 112:192–6. doi: 10.1016/j.ejogrb.2003.06.012
34. Shakhari K, Ben Eliahu S, Loewenthal R, Rosenne E, Carp H. Differences in number and activity of peripheral natural killer cells in primary versus secondary recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* (2003) 80:368–75. doi: 10.1016/S0015-0282(03)00611-3
 35. Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, et al. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol.* (2001) 46:132–6. doi: 10.1111/j.8755-8920.2001.460203.x
 36. Szekeres-Bartho J, Hadnagy J, Pacsa AS. The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *J Reprod Immunol.* (1985) 7:121–8 doi: 10.1016/0165-0378(85)90066-X
 37. Hansen KA, Opsahl MS, Nieman LK, Baker JR Jr, Klein TA. Natural killer cell activity from pregnant subjects is modulated by RU 486. *Am J Obstet Gynecol.* (1992) 166:87–90 doi: 10.1016/0002-9378(92)91835-X
 38. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med.* (2003) 198:1201–12. doi: 10.1084/jem.20030305
 39. Rukavina D, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER. Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* (1995) 33:394–404 doi: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb00908.x
 40. Crncic TB, Laskarin G, Frankovic KJ, Tokmadzic VS, Strbo N, Bedenicki I, et al. Early pregnancy decidual lymphocytes beside perforin use Fas ligand (FasL) mediated cytotoxicity. *J Reprod Immunol.* (2007) 73:108–17. doi: 10.1016/j.jri.2006.07.001
 41. Laskarin G, Strbo N, Sotosek V, Rukavina D, Faust Z, Szekeres-Bartho J, et al. Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol.* (1999) 42:312–20. doi: 10.1111/j.1600-0897.1999.tb00107.x
 42. Huang B, Faucette AN, Pawlitz MD, Pei B, Goyert JW, Zhou JZ, et al. Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat Med.* (2017) 23:128–35. doi: 10.1038/nm.4244
 43. Leitenberg D, Boutin Y, Constant S, Bottomly K. CD4 regulation of TCR signaling and T cell differentiation following stimulation with peptides of different affinities for the TCR. *J Immunol.* (1998) 161:1194–203
 44. Krummel MF, Sjaastad MD, Wülfing C, Davis MM. Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science.* (2000) 289:1349–52. doi: 10.1126/science.289.5483.1349
 45. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol.* (1995) 154:97–105
 46. Dong C, Flavell RA. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res.* (2000) 2:179–88. doi: 10.1186/ar85
 47. Rautajoki KJ, Kylaniemi MK, Raghav SK, Rao K, Lahesma A. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann Med.* (2008) 40:322–35. doi: 10.1080/07853890802068582
 48. Ober C, Hyslop T, Elias S, Weitkamp LR, Hauck WW. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study. *Hum Reprod.* (1998) 13:33–8. doi: 10.1093/humrep/13.1.33
 49. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* (1993) 14:353–6. doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-D
 50. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* (1997) 10:478–82. doi: 10.1016/S0167-5699(97)01127-4
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Csabai, Pallinger, Kovacs, Miko, Bognar and Szekeres-Bartho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.