

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

Doktori (Ph.D.) – értekezés tézisei

Csabai- Tanics Tímea Judith

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Reglődi Dóra

Programvezető: Dr. Mikó Éva

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

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Biológiai Intézet



Pécs

2024

BEVEZETÉS

A fejlett országokban egyre gyakoribb a meddőség előfordulása, ami részben azzal magyarázható, hogy az első terhesség vállalása magasabb életkorra tolódik. A magasabb anyai életkor negatívan befolyásolja mind az endometrium állapotát, mind az embriók minőségét [1]. A sikeres terhesség egyik első lépése a blasztociszta beágyazódása a fogadóképes endometriumba. Az implantáció során az embrió megtapad az endometriális hámrétegen, implantálódik és a trofoblaszt behatol a decidualizálódott endometriumba [2]. A progeszteron kulcsfontosságú szerepet játszik ebben a folyamatban, hatásait a progeszteron receptorok (PR-A és PR-B) közvetítik. [3] A PR-A elengedhetetlen az endometrium deciduális átalakulásához és az endometriális receptivitás kialakulásához, míg a PR-B az emlőmirigy fejlődésében vesz részt [4].

A beágyazódási zavarok egyrészt az endometrium nem megfelelő fejlődése, másrészt az embrió elégtelen implantációs képessége miatt alakulnak ki.

Kutatásunk célja az implantációt befolyásoló immunológiai mechanizmusok vizsgálata és a jó implantációs képességgel rendelkező embriók azonosítása.

Normális terhesség során az anyai immunrendszer felismeri, de nem támadja meg a magzat által kifejezett apai antigéneket [5]. A progeszteron indukálta blokkoló faktor (PIBF) különböző terhességgel összefüggő szövetekben (decidua, placenta, amnion) és a szérumban is jelen van. Szérumkoncentrációja a terhesség során folyamatosan növekszik [6].

A filogenetikailag konzervált PIBF génről 16 különböző mRNS keletkezik a transzkripció során. A leghosszabb ezek közül 18 exont tartalmaz, és egy 90 kDa-os fehérjét kódol [7]. A teljes hosszúságú PIBF a centroszómahoz kötődik [8], míg a kisebb izoformák a citoplazmában helyezkednek el és szekretálódnak [9]. A kis izoformák befolyásolják az immunválaszt, elősegítve a Th2 domináns citokin termelést, gátolva az NK sejtek aktivitását [10].

Extracelluláris vezikulák (EV-k)

Az embrió és az anyai szervezet közötti kommunikációt az extracelluláris vezikulák (EV-k) segítik elő. Ezek "szállítóeszközök", amelyeket kettős foszfolipid membrán vesz körül, és különféle molekulákat szállítanak, például: DNS, RNS, fehérjék (MHC molekulák, citokinek). Méretük alapján az EV-k három csoportba sorolhatók: exoszómák (100 nm alatti átmérő), mikrovezikulumok (100-800 nm), és apoptotikus testek (1000 nm feletti átmérő) [11].

Az EV-k szerepet játszanak a megtermékenyítésben, mivel a spermiumok túléléséhez és mozgékonyágához szükséges enzimeket tartalmaznak [12, 13], és olyan fehérjéket hordoznak, amelyek megkönnyítik az embrió és az anyai immunrendszer közötti kommunikációt. Az EV-k implantációban betöltött szerepe kevésbé ismert, de feltételezhető, hogy az embrió által termelt EV-k befolyásolhatják az anyai immunválaszt. Az extravillózus

trofoblasztok által termelt EV-k például humán leukocita antigén G (HLA-G) molekulát hordoznak, amely ligandumként működik a decíduális NK sejtek gátló receptorán, és szerepet játszhat az anyai immun tolerancia kialakításában [14- 17].

Kutatásunk célja volt megvizsgálni:

- a PIBF szerepét az implantáció során,
- hogyan befolyásolják az embrióból származó EV-k az anyai immunválaszt,
- és hogy van-e olyan marker az emberi embriók tenyésztése során termelt EV-kben, amely képes azonosítani a legnagyobb beültetési potenciállal rendelkező embriókat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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

A kétsejtes embriókat 1,5 napos vemhes CD1 egerek petevezetékeiből izoláltuk, és KSOM médiumban tenyésztettük 37°C-on, 5%-os CO₂-koncentráció és 100%-os páratartalom mellett, amíg el nem érték a 4, 8 sejtes, morula vagy blasztociszta stádiumot. Az embriókat 4%-os paraformaldehid (PFA) oldatban fixáltuk 25 percig szobahőmérsékleten, majd PBS-ben mostuk és 0,5%-os Triton X-100-zal permeabilizáltuk. Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os hidrogén-peroxid oldattal blokkoltuk, a nem specifikus kötőhelyeket 1%-os BSA- val blokkoltuk. Az embriókat az elsődleges antitestekkel (VEGF, IGF2, PIBF, LIF, PLGF, TNF α , PAI1, MIF) 1 órán keresztül inkubáltuk, majd torma peroxidázzal (HRP) konjugált szekunder antitesttel fél órát. A reakciót diaminobenzidin (DAB) reakcióval vizualizáltuk, és az eredményeket fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

PIBF implantációban betöltött szerepének vizsgálata egérmodellben

8-12 hetes nőstény CD1 egereket pároztattunk hím CD1 egerekkel. A vemhesség 1,5. és 4,5. napján az egereket intraperitoneálisan (i.p.) kezeltük anti-PIBF antitesttel annak érdekében, hogy semlegesítsük a PIBF biológiai hatását. A kontroll egerek PBS-t kaptak anti-PIBF antitest helyett. A vemhesség 10,5. napján az egereket nyaki diszlokációval áldoztuk fel, és meghatároztuk az implantációs helyek számát és a rezorbeálódott embriók arányát.

PIBF+ NK sejtek és B sejtek azonosítása PIBF-deficiens egerek decíduájában

Az implantációs helyeket 6%-os pufferelt formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, és 5 μ m-es metszeteket készítettünk. Immunhisztokémiai reakciót végeztünk biotinilált monoklonális anti-PIBF antitesttel és HRP-konjugált streptavidin használatával, a PIBF+ NK sejtek azonosítása érdekében.

Az Alexa647 fluorokrómmal konjugált B220 antitestet és fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált monoklonális anti-PIBF-et használtuk a B sejtek azonosítására.

Citotoxicitási tesztek:

A decíduális és perifériás NK sejtek citotoxikus aktivitását PKH67 vitális festékkel festett YAC-1 célsejtek segítségével határoztuk meg. A célsejtek propidium-jodid (PI) festődését flow citometriával elemeztük, és a citotoxicitást a PKH67+ populációban lévő PI+ sejtek százalékával fejeztük ki.

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

Prime PCR 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 használva, mágneses szeparálással izoláltuk a CD4+ és CD8+ T sejteket. Az izolált sejteket mostuk, majd a sejtszámokat 5×10^6 /ml-re állítottuk be. Annak érdekében, hogy az RNS stabil maradjon az izolált CD4+ és CD8+ sejteket RNALater-ICE oldatban tároltuk felhasználásig. A mintákból totál RNS-t izoláltunk. 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.

Elektronmikroszkópos feldolgozás, immun elektronmikroszkópia

Öt napos terhes egér endometrium kb. 1 mm^3 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 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 ultramikrotóm segítségével félvékony metszeteket készítettünk, melyeket toluidin-kékkel festettünk. Ezután ultramikrotómmal sorozatos ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket uranil acetáttal és ólomcitráttal kontrasztosítottunk, majd JEOL 1200EX-II elektron mikroszkóppal vizsgáltunk.

Az embrió által termelt, az embrió környezetében található EV-k PIBF tartalmát immun elektronmikroszkópiával vizsgáltuk. Tenyésztett és 4% formaldehiddel fixált morula stádiumú embriót nyúlban termelt monoklonális anti-PIBF ellenanyaggal [6] reagáltattuk 2 óráig szobahőmérsékleten, majd HRP konjugált anti-nyúl másodlagos antitesttel inkubáltuk. A reakciót DAB-bal tettük láthatóvá. Az immunreakció után az embriókat 3% -os agar oldatba ágyasztuk, amelyből megszilárdulás után 1 mm^3 méretű blokkokat vágunk és a fent leírtak szerint előkészítettünk elektronmikroszkópos vizsgálatra.

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

Másfél napos terhes CD1 egerekből izolált kétsejtes embriókat in vitro tenyésztettük 72 órán át blasztociszta stádiumig. 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. A médiumban lévő EV-ket PE konjugált annexin V jelöléssel és flow citométerrel vizsgáltunk.

Néhány mintát detergenssel kezeltünk. A detergens feloldja az EV-k membránját ezért a kezelés hatására eltűnt jeleket EV-knek tekinthetjük.

EV-k kötődésének vizsgálata egér perifériás limfocitáihoz

Tizenhat hetes CD1 egér lépét izoláltuk majd sejtszuspenziót készítettünk belőle. A CD4+ Th sejteket APC konjugált anti- egér CD4 antitesttel, a CD8+ Tc sejteket PECy7 konjugált anti- egér CD8 antitesttel jelöltük. A CD4+ és CD8+ sejtek felszínén expresszálódó foszfatidilszerin receptor (PSR) detektálásához jelöletlen anti-foszfatidilszerin receptor antitestet, majd FITC konjugált másodlagos antitestet (anti- nyúl IgG) használtunk. Festési kontrollként az elsődleges antitestet kihagytuk a reakcióból. A PKH-val jelölt EV-eket 5×10^4 CD4 és CD8 jelölt limfocitával inkubáltuk, 4% BSA jelenlétében 4 °C-on. A BSA jelenléte megakadályozza, hogy a szabad PKH a limfocitákhoz kössön. EV-eket nem tartalmazó hígított PKH festékkoldatot (álfestett kontroll) használtunk a nem specifikus (EV-független) festődés vizsgálatára. Az inkubációs idő után a sejteket PBS-el mostuk, majd áramlási citométerrel mértük.

Limfociták IL-10 termelésének vizsgálata

A CD4- és CD8-ellenes antitestekkel jelölt lépsejteket embrióból származó EV-kkel stimuláltunk 4 órán keresztül, majd 15-30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltunk PE-konjugált anti- egér IL-10 monoklonális antitesttel. A sejteket kétszer mostuk 2 ml PBS-ben, 5 percig, 300 g-vel centrifugáltuk, és 300 µl 2%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A festett sejteket 4 °C-on, sötétben tároltuk felhasználásig. 5×10^4 sejtet mértünk meg flow citométerrel a festés napján. Minden FACS adatot CellQuestPro szoftverrel elemeztünk.

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

Az IVF-kezelésen átesett nők embrióit egyenként G-1 médiumban tenyésztették három napig, majd a médiumot G-2 médiumra cserélték, és az embriókat további két napig tenyésztették. Az 5. napon a tenyésztő médiumot leszívták és -80°C-on tárolták.

Áramlási citometria:

Az EV-k abszolút számát belső standard gyöngyök segítségével határoztuk meg. Az EV-k nukleinsav-tartalmát propidium-jodid (PI) festéssel detektáltuk és BD FACSCalibur áramlási citométerrel vizsgáltuk. A beállításhoz és kapuzáshoz Megamix-Plus SSC gyöngyöket használtunk.

EREDMÉNYEK

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 sejt, 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.

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-PIBF antitesttel kezeltük, hogy az implantációs ablakban funkcionálisan PIBF-hiányosak legyenek. Az egereket a terhesség 10,5. napján áldoztuk fel. Ez lehetővé tette számunkra, hogy ne csak az implantációs helyeket, hanem az implantálódott embriók rezorpciós arányát is vizsgáljuk. Míg a kontrollcsoportban az átlagos implantálódott embrió szám 6,5 volt, az anti-PIBF antitesttel a peri-implantációs időszakban kezelt nőstényeknél az átlagos implantációs helyek száma négyre csökkent. A kontrollcsoportban tapasztalt szokatlanul alacsony 2%-os rezorpciós arány 40%-ra nőtt a funkcionálisan PIBF-hiányos egereknél.

Az anti- PIBF kezelés hatására csökken a PIBF pozitív decíduális NK sejtek száma

Egy korábbi tanulmányban kimutattuk, hogy a 12,5. napos vemhes egerek decíduájában nagy számban található nagy, granulált sejtek, amelyek citoplazmatikus granulumjaiban erős PIBF-pozitivitás mutatható ki. Ezeket a sejteket a PAS+ DBA+ uterin NK sejtekként azonosítottuk. A PIBF ko-lokalizált perforinnel a sejtek citoplazmatikus granulumjaiban [18].

Az anti- PIBF-fel kezelt egerek decíduájában szignifikánsan alacsonyabb számú PIBF pozitív NK sejtet találtunk a kontrollhoz képest. A kontroll egerek spontán rezorbeálódott embrióinak decíduájában hasonlóképpen csökkent számú PIBF+ NK sejtet találunk, ami arra enged következtetni, hogy a rezorpció PIBF+ limfociták hiányára vezethető vissza.

A funkcionálisan PIBF-hiányos egerek fokozott NK-sejt aktivitást mutatnak

Az anti-PIBF kezelt egerek perifériás, és decíduális NK sejteinek citotoxikus aktivitása jelentősen megnövekedett.

Decíduális B- sejtek az anti-PIBF kezelés hatására depletálódtak

A kontroll állatok endometriumban decíduális NK sejtek és egy diszkrét réteg B-sejt volt jelen a choriodecidualis határon. Míg az NK sejtek továbbra is jelen voltak, a B-sejtek eltűntek az anti-PIBF-fel kezelt egerek reszorbeált embrióinak decíduájából. Egy nemrégiben készült tanulmány kimutatta, hogy a decíduális B-sejtek által az IL-33 által indukált PIBF1 expresszió megakadályozza a koraszülést mind emberekben, mind egerekben. Bár a B-sejtek csak kisebb populációt alkotnak a decíduális limfociták között, mégis fontosak lehetnek a decídua immunológiai egyensúlyának fenntartásában [19].

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 kontrol egerek perifériás limfocitában. Ezek közül tizenkettő jelentősen magasabb vagy alacsonyabb expressziót mutatott az anti-PIBF-fel kezelt egerek limfocitáiban a kontrollokhöz képest. Az eredmények elemzésekor az eltérően expresszáló géneket a következő csoportokba soroltuk: (1) T sejt aktivációban részt vevő gének, (2) Th1 differenciálódásban részt vevő gének, és (3) Th2 differenciálódásban részt vevő gének.

A T sejt aktivációban szerepet játszó CD3 komplex tagjai (CD247, CS3D, 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. Az anti-PIBF-kezelt egerekben az IL2R béta lánc expressziója lecsökkent a CD4+ populációban, míg a CD8+ populációban az IL2R alfa és gamma lánc, valamint az IL2 expresszió növekedett. A ko-stimulációs molekulák génjei hasonló módon változtak. Az anti-PIBF kezelés hatására a CD4, CD28, CD40L és CD86 gének kifejeződése lecsökkent a CD4+ populációban és megnövekedett a CD8+ populációban. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PIBF hiánya gátolja a CD4+ sejtek aktivációját és elősegíti a CD8+ T sejtek aktivációját.

A PIBF+ EV-k hatása a CD8+ T sejtek citokin termelésére

Immun-elektronmikroszkópiával megerősítettük, hogy az embrióból származó EV-k PIBF-et tartalmaznak. Az embrióból származó EV-k jelenlétében a CD8+ T sejtek IL-10 termelése megnövekedett, és ezt a hatást az EV-k anti-PIBF antitesttel történő előkezelése megakadályozta. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a terhesség korai szakaszában az embrióból származó szignálok módosíthatják az anyai immunválaszt annak érdekében, hogy toleráns környezetet alakítsanak ki a fejlődő magzat számára.

Az in vitro tenyésztett embriók által termelt nukleinsav tartalmú EV-k száma jelzi az embrió implantációs képességét

A vizsgálatba 88 IVF-kezelés alatt álló nő került bevonásra. A legtöbb páciensnél több mint egy embriót ültettek be. Az embrióbeültetés 58 nőnél klinikai terhességet eredményezett, míg 30 nőnél az implantáció sikertelen volt. A "klinikai terhesség" csoportból származó 112 embrió tenyésztési médiumában a PI+ EV-k száma jelentősen alacsonyabb volt, mint a "sikertelen implantáció" csoport 49 embriójában. 14 nőnél egyetlen embrió beültetése egyes terhességet, míg két embrió beültetése ikerterhességet eredményezett. A 20 "megerősített kompetens" embrióból 19 embrió tenyésztési médiumában a PI+ EV-k szintje alacsonyabb volt a határértéknél, ami azt sugallja, hogy a kompetens embrió valóban azonosítható alacsony PI+ EV számmal. Kifejlesztettünk egy nem invazív, egyszerű, olcsó és gyors tesztet, amely azonosítja a legvalószínűbben implantálódó embriókat.

A kutatási eredmények azt mutatják, hogy a PIBF és az EV-k kulcsfontosságú szerepet játszanak az embrió implantációjában és az anyai immunválasz szabályozásában. A PIBF semlegesítése negatívan befolyásolja az implantációt és növeli az embrió reszorpciós arányát, míg az EV-k jelenléte és tartalma előrejelezheti a sikeres embrió beültetést. Ezek az eredmények javítják a meddőség kezelését és az IVF eljárások hatékonyságát.

DISZKUSSZIÓ

Korábbi eredmények arra utalnak, hogy a PIBF aktív szerepet játszhat az implantációban [20]. E hipotézis megerősítése érdekében az egerek peri-implantációs időszakában semlegesítettük a PIBF biológiai aktivitását, és megvizsgáltuk a funkcionális PIBF-hiány következményeit több szinten.

A terhes egerek peri-implantációs időszakában végzett anti-PIBF kezelés eredményeként az implantációs helyek száma jelentősen csökkent, és az implantációk, amelyek mégis megtörténtek, kompromittáltak bizonyultak a magas reszorpciós arányok alapján.

Tovább vizsgáltuk a sikertelen implantáció és a rezorpció mechanizmusait a funkcionálisan PIBF-hiányos egerekben. A sikertelen terhességek magas perifériás NK aktivitással jellemezhetők, mind embereken, mind egereken [20- 28].

A decíduális NK sejtek a decíduális limfociták 60%-át alkotják. Annak ellenére, hogy citotoxikus granulumjaikban perforin és granzim áll rendelkezésre [29], ezeknek a sejteknek nagyon mérsékelt citotoxikus potenciáljuk van [30, 31], de angiogén faktorokat és citokineket választanak ki [29].

A decíduális NK sejtek alacsony citotoxikus aktivitása a citoplazmatikus granulumjaikban lévő PIBF jelenlétének tulajdonítható [18]. A PIBF blokkolja a perforin expressziójának upregulációját az aktivált decíduális limfocitákban és gátolja az NK sejtek citotoxicitását a granulum exocitózisának blokkolásával [32, 33]. Bogdan és munkatársai kimutatták, hogy a 12,5. napos vemhes egerek decíduájában nagy számban található PIBF+ NK sejtek [18].

Kimutattuk, hogy az anti-PIBF kezelés a peri-implantációs időszakban a PIBF+ NK sejtek csökkent jelenlétét eredményezi a 10,5. napos decíduában, valamint jelentősen növeli a decíduális és perifériás NK aktivitást, összehasonlítva a kontroll csoporttal.

A középidős terhes egerek anti-PIBF kezelése fokozza mind a perifériás NK aktivitást, mind a reszorpciós arányokat. Az anti-PIBF-fel kezelt egerekben megemelkedett reszorpciós arányok korrigálhatók az egerek egyidejű anti-NK antitestekkel történő kezelésével [34], ami arra utal, hogy a PIBF megakadályozza a terhesség megszakadását az egerekben - legalább részben - az NK aktivitás blokkolásával. **A PIBF+ decíduális NK sejtek elvesztése miatti fokozott decíduális NK aktivitás az egyik oka lehet az anti-PIBF-fel kezelt egerekben tapasztalt magasabb reszorpciós arányoknak.**

A B-sejtek kisebb populációt alkotnak a decíduális limfociták között, ám mégis fontosak lehetnek a decida immunológiai egyensúlyának fenntartásában. Egy nemrégiben készült tanulmány kimutatta, hogy a decíduális B-sejtek IL-33 által indukált PIBF1 expressziója megakadályozza a koraszülést mind embereken, mind egereken [19].

Kísérletünkben a 10,5. napos terhes kontroll egerek choriodecidualis határán egy különálló B-sejt réteget detektáltunk. Ezek a sejtek teljesen hiányoztak azoknak az egereknek a decíduájából, amelyeket a peri-implantációs időszakban anti-PIBF-fel kezeltünk.

Összefoglalva, feltételezhető, hogy az anti-PIBF kezelés - a deciduális B-sejtek depletálásával – a későbbiekben veszélyezteti a terhességet a PIBF-pozitív B-sejtek hiánya miatt [19].

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 CD4+ T-sejtek aktivációja a T-sejt receptor és egy ko-stimulációs molekula egyidejű bekapcsolódása révén történik, amelyeket az APC-n található MHC II peptid és a ko-stimulációs molekulák aktiválnak. Ko-stimuláció hiánya a T-sejt receptor jelátvitel anergiát eredményez.

A TCR alfa/béta mellett számos más sejtfelszíni receptor is aktiválódik az APC-ken lévő ligandumok révén, amelyek szabályozzák a Th-sejtek differenciálódását. A CD4 egy sejtfelszíni adhéziós molekula, amely az MHC II -höz kötődik és stabilizálja a T-sejtek és az APC-k közötti kölcsönhatást [35, 36]. A CD28 egy ko-stimulációs receptor a T-sejteken, amely a CD80 és CD86 molekulákhoz kötődik az aktivált APC-ken [37]. A TCR alfa/béta/CD3 komplex biztosítja az első jelet, míg a CD28 a második jelet a T-sejt aktivációhoz. Mindkét jel szükséges az IL-2 termeléshez és a T-sejt proliferációhoz. Az aktivált T-sejtek által expresszált CD40 ligand a CD40-hez kötődik az APC-ken, elindítva a T-sejt közvetítette immunválaszt [38].

Kísérletünk kimutatta, hogy a T-sejt receptor CD3 komplex tagjainak expressziója jelentősen lecsökkent az anti-PIBF-fel kezelt egerek CD4+ T-sejtjében, míg a CD3D és az IL2R B és G gének upregulálódtak a CD8+ sejtekben, ami arra utal, hogy a Th-sejt aktiváció nagymértékben gátolt az anti-PIBF-fel kezelt terhes egerekben.

Az IL-4 a fő citokin, amely a Th2 sejtek differenciálódását irányítja. Az IL-4-et különböző sejttípusok termelik, beleértve a hízósejteket, a bazofileket, az eozinofileket, az NK sejteket, az aktivált CD4+ T-sejteket és a differenciálódott Th2 sejteket [39].

Kimutattuk, hogy az IL-4 génexpressziója jelentősen lecsökkent a CD4+ sejtekben, míg az IL-12A gén expressziója magasabb lett az anti-PIBF-fel kezelt egerek CD8+ sejteiben.

A fenti adatok azt mutatják, hogy a PIBF nélkülözhetetlen a Th2 domináns citokin egyensúly megteremtéséhez.

Ez felveti a kérdést, hogy az anyai immunrendszer hogyan kapja meg az információt arról, hogy a terhesség létrejött.

Az embrióból származó extracelluláris vezikulák kimutathatók az embrió tápfolyadékában, valamint az implantációs helyen. Az embrióból származó EV-k PIBF tartalmát immun-elektronmikroszkópiával igazoltuk, és ezek az EV-k megnövelték az IL-10 termelést egér lépsejtekben. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a pre- implantációs és a már implantálódott embrió PIBF+ EV-k küldésével tudatja jelenlétét az anyával, ami Th2 irányba tolja az anyai immunválaszt.

Mára bőséges bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az anyai immunrendszer által a paternális antigének felismerése nemcsak ártalmatlan, hanem feltétlenül szükséges is ahhoz, hogy beinduljanak azok a mechanizmusok, melyek toleranciát eredményeznek a magzattal szemben [40]. A magzati antigének felismerését követően az immunrendszer aktiválódik, ami szabályozó mechanizmusok, például a Th2 domináns immunválasz kialakulásához vezet [41, 42].

A PIBF semlegesítése a peri-implantációs időszakban ezt a mechanizmust már a kezdetekor megzavarja. A CD4+ T-sejtek aktivációja zavart szenved, a T-sejtek Th1 irányba differenciálódnak, és ennek következtében az implantáció és a terhesség folyamata is veszélybe kerül.

Az ikerterhesség a koraszülés leggyakoribb oka. Az asszisztált reprodukciós eljárások célja az egyes terhesség elérése egyetlen embrió beültetésével. Ehhez jobb módszerekre van szükség a kompetens embrió azonosításához. **Kísérletünkben egy ilyen tesztet dolgoztunk ki, amely az 5. napos embrió tenyésztő folyadékában található nukleinsavat (PI+) tartalmazó extracelluláris vezikulumok (EV) számának áramlási citometriás meghatározásán alapul. A teszt nem invazív, egyszerű, olcsó és gyors, és azonosítja a legvalószínűbben implantálódó embriókat.**

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] A. Chemerinski, J. Garcia de Paredes, K. Blackledge, N. C. Douglas, and S. S. Morelli, “Mechanisms of endometrial aging: lessons from natural conceptions and assisted reproductive technology cycles,” *Front Physiol*, vol. 15, p. 1332946, Feb. 2024, doi: 10.3389/FPHYS.2024.1332946/BIBTEX.
- [2] S. Pawar, A. M. Hantak, I. C. Bagchi, and M. K. Bagchi, “Minireview: Steroid-Regulated Paracrine Mechanisms Controlling Implantation,” *Molecular Endocrinology*, vol. 28, no. 9, pp. 1408–1422, Sep. 2014, doi: 10.1210/ME.2014-1074.
- [3] R. Fernandez-Valdivia *et al.*, “Revealing progesterone’s role in uterine and mammary gland biology: insights from the mouse,” *Semin Reprod Med*, vol. 23, no. 1, pp. 22–37, Feb. 2005, doi: 10.1055/S-2005-864031.
- [4] B. Mulac-Jericevic, R. A. Mullinax, F. J. DeMayo, J. P. Lydon, and O. M. Conneely, “Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform,” *Science (1979)*, vol. 289, no. 5485, pp. 1751–1754, Sep. 2000, doi: 10.1126/SCIENCE.289.5485.1751/SUPPL_FILE/1051453S2_THUMB.GIF.
- [5] W. D. Billington, “2 The normal fetomaternal immune relationship,” *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, vol. 6, no. 3, pp. 417–438, Sep. 1992, doi: 10.1016/S0950-3552(05)80004-5.
- [6] B. Polgár, E. Nagy, E. ’ Va Mikó, P. Varga, and J. Lia Szekeres-Barthó, “Urinary Progesterone-Induced Blocking Factor Concentration Is Related to Pregnancy Outcome 1,” *Biol Reprod*, vol. 71, pp. 1699–1705, 2004, doi: 10.1095/biolreprod.104.030437.
- [7] B. Polgar *et al.*, “Molecular Cloning and Immunologic Characterization of a Novel cDNA Coding for Progesterone-Induced Blocking Factor,” *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 11, pp. 5956–5963, Dec. 2003, doi: 10.4049/JIMMUNOL.171.11.5956.
- [8] K. Kim and K. Rhee, “The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole,” *J Cell Sci*, vol. 124, no. 3, pp. 338–347, Feb. 2011, doi: 10.1242/JCS.078329.
- [9] M. Lachmann *et al.*, “PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome,” *Int J Cancer*, vol. 112, no. 1, pp. 51–60, Oct. 2004, doi: 10.1002/IJC.20326.

- [10] N. Kozma *et al.*, “Progesterone-Induced Blocking Factor Activates STAT6 via Binding to a Novel IL-4 Receptor,” *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 2, pp. 819–826, Jan. 2006, doi: 10.4049/JIMMUNOL.176.2.819.
- [11] M. Yáñez-Mó *et al.*, “Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions,” *J Extracell Vesicles*, vol. 4, no. 1, p. 27066, Jan. 2015, doi: 10.3402/JEV.V4.27066.
- [12] G. Frenette, M. Thabet, and R. Sullivan, “Polyol pathway in human epididymis and semen,” *J Androl*, vol. 27, no. 2, pp. 233–239, Mar. 2006, doi: 10.2164/JANDROL.05108.
- [13] J. S. Oh, C. Han, and C. Cho, “ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane,” *Mol Cells*, vol. 28, no. 5, pp. 441–446, Nov. 2009, doi: 10.1007/S10059-009-0140-X/METRICS.
- [14] L. A. Burnett, M. M. Light, P. Mehrotra, and R. A. Nowak, “Stimulation of GPR30 Increases Release of EMMPRIN-Containing Microvesicles in Human Uterine Epithelial Cells,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 97, no. 12, p. 4613, 2012, doi: 10.1210/JC.2012-2098.
- [15] Y. H. Ng *et al.*, “Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e58502, Mar. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0058502.
- [16] C. Gercel-Taylor, S. M. O’Connor, G. K. Lam, and D. D. Taylor, “Shed membrane fragment modulation of CD3-zeta during pregnancy: link with induction of apoptosis,” *J Reprod Immunol*, vol. 56, no. 1–2, pp. 29–44, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0165-0378(02)00025-6.
- [17] E. Pallinger, A. Kiss, Pap E, S. Tóth, and A. Falus, “BeWo-derived microvesicles modulate T cell differentiation by the downregulation of IL-6Ralpha expression on CD4 + T lymphocytes,” *J Extracell Vesicles*, vol. 1, Jan. 2012, Accessed: Dec. 29, 2022. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3402/jev.v1i0.18182>
- [18] A. Bogdan, G. Berta, and J. Szekeres-Bartho, “PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua,” *J Reprod Immunol*, vol. 119, pp. 38–43, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.JRI.2016.12.001.
- [19] B. Huang *et al.*, “Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor,” *Nat Med*, vol. 23, no. 1, pp. 128–135, Jan. 2017, doi: 10.1038/NM.4244.

- [20] B. Mulac-Jeričević, S. Šućurović, T. Gulic, and J. Szekeres-Bartho, “The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the mouse endometrium,” *Am J Reprod Immunol*, vol. 81, no. 5, May 2019, doi: 10.1111/AJI.13104.
- [21] A. R. de Fougères and M. G. Baines, “Modulation of the natural killer cell activity in pregnant mice alters the spontaneous abortion rate,” *J Reprod Immunol*, vol. 11, no. 2, pp. 147–153, Jun. 1987, doi: 10.1016/0165-0378(87)90018-0.
- [22] R. KINSKY, G. DELAGE, N. ROSIN, M. N. THANG, M. HOFFMANN, and G. CHAOUAT, “A Murine Model of NK Cell Mediated Resorption,” *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 23, no. 3, pp. 73–77, Jul. 1990, doi: 10.1111/J.1600-0897.1990.TB00675.X.
- [23] K. Aoki *et al.*, “Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage,” *Lancet*, vol. 345, no. 8961, pp. 1340–1342, May 1995, doi: 10.1016/S0140-6736(95)92539-2.
- [24] K. Fukui, I. Yoshimoto, K. Matsubara, R. Hori, H. Ochi, and M. Ito, “Leukocyte function-associated antigen-1 expression on decidual natural killer cells in patients with early pregnancy loss,” *Mol Hum Reprod*, vol. 5, no. 11, pp. 1083–1088, Nov. 1999, doi: 10.1093/MOLEHR/5.11.1083.
- [25] E. I. Ntrivalas *et al.*, “Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology,” *Hum Reprod*, vol. 16, no. 5, pp. 855–861, 2001, doi: 10.1093/HUMREP/16.5.855.
- [26] E. I. Ntrivalas, C. R. Bowser, J. Kwak-Kim, K. D. Beaman, and A. Gilman-Sachs, “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*, vol. 53, no. 5, pp. 215–221, 2005, doi: 10.1111/J.1600-0897.2005.00268.X.
- [27] L. Putowski, D. Darmochwal-Kolarz, J. Rolinski, J. Oleszczuk, and J. Jakowicki, “The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure (Preliminary study),” *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 112, no. 2, pp. 192–196, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.ejogrb.2003.06.012.
- [28] K. Shakhar, S. Ben-Eliyahu, R. Loewenthal, E. Rosenne, and H. Carp, “Differences in number and activity of peripheral natural killer cells in primary versus secondary recurrent miscarriage,” *Fertil Steril*, vol. 80, no. 2, pp. 368–375, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0015-0282(03)00611-3.

- [29] L. A. Koopman *et al.*, “Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential,” *J Exp Med*, vol. 198, no. 8, pp. 1201–1212, Oct. 2003, doi: 10.1084/JEM.20030305.
- [30] D. RUKAVINA, G. RUBEŠA, L. GUDELJ, H. HALLER, and E. R. PODACK, “Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy,” *Am J Reprod Immunol*, vol. 33, no. 5, pp. 394–404, 1995, doi: 10.1111/J.1600-0897.1995.TB00908.X.
- [31] T. B. Crncic *et al.*, “Early pregnancy decidual lymphocytes beside perforin use Fas ligand (FasL) mediated cytotoxicity,” *J Reprod Immunol*, vol. 73, no. 2, pp. 108–117, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.JRI.2006.07.001.
- [32] Zs. Faust, G. Laškarin, and D. Rukavina, “Progesterone-Induced Blocking Factor Inhibits Degranulation of Natural Killer Cells,” *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 42, no. 2, pp. 71–75, Aug. 1999, doi: 10.1111/J.1600-0897.1999.TB00468.X.
- [33] G. Laškarin *et al.*, “Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells,” *Am J Reprod Immunol*, vol. 42, no. 5, pp. 312–320, 1999, doi: 10.1111/J.1600-0897.1999.TB00107.X.
- [34] J. Szekeres-Bartho, G. Par, G. Dombay, Y. C. Smart, and Z. Volgyi, “The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity,” *Cell Immunol*, vol. 177, no. 2, pp. 194–199, May 1997, doi: 10.1006/CIMM.1997.1090.
- [35] D. Leitenberg, Y. Boutin, S. Constant, and K. Bottomly, “CD4 Regulation of TCR Signaling and T Cell Differentiation Following Stimulation with Peptides of Different Affinities for the TCR,” *The Journal of Immunology*, vol. 161, no. 3, pp. 1194–1203, Aug. 1998, doi: 10.4049/JIMMUNOL.161.3.1194.
- [36] M. F. Krummel, M. D. Sjaastad, C. W. Wulfing, and M. M. Davis, “Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition,” *Science*, vol. 289, no. 5483, pp. 1349–1352, Aug. 2000, doi: 10.1126/SCIENCE.289.5483.1349.
- [37] L. L. Lanier *et al.*, “CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL,” *J Immunol*, vol. 154, no. 1, pp. 97–105, Jan. 1995.
- [38] C. Dong and R. A. Flavell, “Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses,” *Arthritis Res*, vol. 2, no. 3, p. 179, 2000, doi: 10.1186/AR85.

- [39] K. J. Rautajoki, M. K. Kyläniemi, S. K. Raghav, K. Rao, and R. Lahesmaa, “An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation,” *Ann Med*, vol. 40, no. 5, pp. 322–335, 2008, doi: 10.1080/07853890802068582.
- [40] C. Ober, T. Hyslop, S. Elias, L. R. Weitkamp, and W. W. Hauck, “Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study.,” *Human Reproduction*, vol. 13, no. 1, pp. 33–38, Jan. 1998, doi: 10.1093/HUMREP/13.1.33.
- [41] T. G. Wegmann, H. Lin, L. Guilbert, and T. R. Mosmann, “Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?,” *Immunol Today*, vol. 14, no. 7, pp. 353–356, Jul. 1993, doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-D.
- [42] R. Raghupathy, “Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy,” *Immunol Today*, vol. 18, no. 10, pp. 478–482, 1997, doi: 10.1016/S0167-5699(97)01127-4.

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. Szívvel 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, biztattak és végig hittek bennem, valamint, köszönöm férjemnek, Tanics Krisztiánnak, hogy végig szeretettel biztatott és támogatott céljaim megvalósításában.

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