

**AZ IVF-ELJÁRÁSSAL FOGANT EGEREK ALLERGIÁRA VALÓ  
HAJLAMÁNAK VIZSGÁLATA, VALAMINT IMMUNCHECKPOINT  
MOLEKULÁK EXPRESSZIÓJA RPL-BEN SZENVEDŐ NŐK PBMC-  
SEJTJEIBEN**

Doktori (Ph.D.) – értekezés tézisei

**Ahmadi Hamid**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Reglődi Dóra

Programvezető: Dr. Mikó Éva

Témavezetők: **Dr. Szekeres- Barthó Júlia és Dr. Bognár Zoltán**

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Biológiai Intézet



Pécs

2025

## BEVEZETÉS

Az asszisztált reprodukciós technikák (ART) során alkalmazott eljárások – például a hormonkezelés, az ivarsejtek és embriók manipulációja, a kémiai és mechanikai behatások, valamint a természetes ivarsejt-kiválasztódás megzavarása – genetikai és epigenetikai változásokat idézhetnek elő. Ezek a módosulások feltehetően növelhetik a különböző rendellenességek kockázatát az ART-eljárással fogant utódok későbbi életében (1).

Az embriók különösen érzékenyek a környezeti hatásokra az implantáció előtti időszakban. A mesterséges megtermékenyítés (IVF) éppen ebben az időszakban történik, amikor a genom jelentős epigenetikai átalakuláson megy keresztül, így bármilyen környezeti változás befolyásolhatja a normális fejlődési programot (2,3).

Az IVF-eljárással fogant gyermekeknél nagyobb lehet a kockázata bizonyos betegségek kialakulásának – például magas vérnyomásnak, anyagcsere-rendellenességeknek vagy epigenetikai eltéréseknek – a természetes úton fogant társaikhoz képest (4,5).

### **Immunológiai változások az ART-eljárással fogant utódoknál**

Az asszisztált reprodukcióval (ART) fogant utódok immunológiai változásait embereken és állatmodelleken is vizsgálták. Számos tanulmány kimutatta, hogy az ART-tal fogant gyermekek immunrendszerének működése megváltozhat, és náluk gyakoribbak lehetnek az immunrendszerrel kapcsolatos betegségek. Például ART-tal fogant egerek kevésbé hatékony immunválaszt alakítottak ki a BCG oltással szemben, amely a T-helper 2 (Th2) domináns válaszok túlsúlyát mutatta. A gyermekkori asztma, allergiák, metabolikus szindróma és egyéb betegségek magasabb előfordulási aránya szintén arra utal, hogy az IVF-eljárás megváltoztathatja az utódok immunrendszerét (6–8).

Bár a pontos ok-okozati összefüggések még nem teljesen tisztázottak, úgy tűnik, hogy a genetikai és környezeti tényezők közötti kölcsönhatások kulcsszerepet játszanak az allergia és az asztma kialakulásában (9,10). Az IgE biológiai hatása összetett, többféle immunsejt működésére is kihat, amelyek részt vesznek az allergiás gyulladások kialakításában. Az IgE az FC $\epsilon$ RI receptoron keresztül kötődik a dendritikus sejtek (DC-k) felszínén, ezáltal fokozza azok antigénprezentáló képességét. Emellett igazolták, hogy az IgE képes megkötni az allergéneket, és elősegíti azok bemutatását a memóriasejtként működő Th2-limfocitáknak (11). Az allergiás betegségek fő közvetítői a Th2-limfociták. Amint ezek aktiválódnak az allergének hatására, serkentik a B-sejteket IgE termelésére, valamint toborozzák és aktiválják a bazofileket, hízósejteket és eozinofileket az IL-4, IL-5 és IL-13 citokinek kiválasztása révén. Különösen az IL-4 vesz részt az IgE-termelés szabályozásában, valamint számos allergiás folyamat kialakulásában (12,13).

#### **Atópiás betegségek kockázata és immunológiai háttér az ART-tal fogant utódoknál**

Számos tanulmány vizsgálta az atópiás betegségek kockázatát az asszisztált reprodukcióval (ART) fogant gyermekek körében. A jelenlegi eredmények azonban nem egységesek: míg egyes kutatások nem találtak szignifikáns összefüggést, több szisztematikus áttekintés, metaanalízis és populációalapú vizsgálat megnövekedett atópiás betegségkockázatról számolt be ezen gyermekeknél (14,15).

A járványtani vizsgálatok eredményeit valószínűleg többféle zavaró tényező is befolyásolja, és az esetleges káros kimeneteleket nem lehet kizárólag az ART-eljárások számlájára írni. Mivel állatkísérletek során a meddőség, mint zavaró tényező, kontrollálható, ezek a vizsgálatok hasznos információt szolgáltathatnak az emberi ART-eredmények hitelesítéséhez. Ennek megfelelően jelen tanulmányunkban IVF-eljárással fogant hím egereket

vizsgáltunk: megmértük a szérum IgE szintjét, valamint a tüdő és a lép tömegét ovalbumin (OVA) injekciót követően, természetes úton fogant egerekkel összehasonlítva.

### **Ismétlődő vetélés (RPL) és immunológiai összefüggései**

Az ismétlődő terhességvesztés (recurrent pregnancy loss, RPL) definíció szerint két vagy több egymást követő vetélés, amelyek a terhesség 20. hete előtt következnek be, és az esetek körülbelül 1–3%-át érintik. Oka lehet például szülői kromoszóma-rendellenesség, endokrin zavar (pl. kezeletlen pajzsmirigy-alulműködés), a méh anatómiai eltérései vagy autoimmun betegségek (16). Ezen kívül fertőzések, trombofilia, immunológiai zavarok, illetve bizonyos környezeti tényezők is összefüggésbe hozhatók RPL-lel (17). Az esetek több mint 50%-ában azonban még átfogó kivizsgálás után sem derül fény a pontos okra – ezek az úgynevezett „magyarázat nélküli” RPL-esetek (16). Feltételezések szerint a rendezetlen anyai immunválasz is hozzájárulhat ezek kialakulásához (17).

A veleszületett és adaptív immunsejtek – például a mieloid sejtek, természetes limfoid sejtek (ILC-k), T-sejtek és B-sejtek – kulcsszerepet játszanak az anyai tolerancia fenntartásában a terhesség során (18). A deciduában jelen lévő CD4/CD8 T-sejtek felismerik a magzati antigéneket, és ezek aktiválódott formái, valamint a regulátoros T-sejtek (Treg) az immunológiai tolerancia közvetítőiként működnek, azáltal, hogy módosítják a lokális immunmikrokörnyezetet. A CD4<sup>+</sup> T-sejtek – különösen a Th1, Th2, Th17 és Treg altípusok – aktívan részt vesznek az anya-magzat közötti immunológiai folyamatokban (19). Az antiinflammatorikus citokinek, mint az IL-10 és a TGF- $\beta$  termelésével a Treg sejtek szabályozzák az immunválaszt a terhesség alatt (20).

Ezek a funkcionális változások magukban foglalják az olyan gátló checkpoint receptorok – mint a programozott sejthalál-1 (PD-1) és a T-sejt immunglobulin- és mucindomén 3 (Tim-3) – fokozott expresszióját. A T-sejt kimerülés csökkent effektorfunkcióval, kevesebb

citokintermeléssel és a PD-1, Tim-3 receptorok felszíni túlexpressziójával jár együtt (21,22). Úgy tűnik, hogy a T-sejtek kimerülése, valamint a PD-1 és Tim-3 jelátvitel jelentős szerepet játszhat az anyai immunológiai tolerancia kialakulásában és a sikeres terhesség fenntartásában – ezért a CD8<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> sejtek száma megváltozhat RPL esetén (23). A kimerült Treg sejtek felszínén PD-1 receptorok találhatóak, és ezek PD-L1 ligandhoz való kötődése *in vitro* növeli a Treg sejtek elnyomó képességét (24).

### **MiRNS-ek (miRNA-k) szerepe RPL-ben és a korai terhességben**

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) számos betegség patomechanizmusában részt vesznek, és alkalmasak lehetnek diagnosztikai vagy prognosztikai biomarkerként is (25,26). Egyes tanulmányok vizsgálták például a miR-138 és miR-155 szerepét az immunsejtek szabályozásában, az embrió morfogenezisében, a sejtosztódásban, sejtmigrációban, őssejtdifferenciálódásban és fejlődésben (27). A miR-138-5p például egy transzkripciós szabályozója a G-protein kapcsolt receptor 124-nek (GPR124), amely befolyásolja az NLRP3 inflammaszóma aktiválódását (27). A kutatások szerint a miR-138-5p expressziója alacsonyabb a vetélés során vett decíduákban a normál terhességekhez képest, ami arra utal, hogy szerepet játszhat az embrió beágyazódásában és a terhesség korai szakaszaiban.

Hasonlóan, a miR-155 a Treg sejtek fő transzkripciós faktorát, a Foxp3-at célozza, és így szabályozza ezek differenciálódását és működését (26). A miR-155 csökkent expressziója módosítja a Treg sejtek gyakoriságát, miközben azok funkciója változatlan marad. Az embrió beágyazódásához és a terhesség korai szakaszához kapcsolódó miRNA-expressziós profilok kóros elváltozásokat tükrözhetnek, amelyek összefüggésbe hozhatók RPL-lel. A miRNS-ek szerepe az abnormális beágyazódáshoz és terhességhez kapcsolódó jelátviteli utak szabályozásában további kutatásokat igényel.

Kutatási célkitűzésünk az volt, hogy összehasonlítsuk a Tim-3 és PD-1 expresszióját CD4+ T-sejteken RPL-ben szenvedő nők perifériás vérében egészséges kontrollokhöz képest. Emellett vizsgáltuk a mir-138 és mir-155 expresszióját PBMC-sejtekben, valamint a TGF- $\beta$  és IP-10 szinteket az RPL-ben szenvedő nők és egészséges kontrollok szérumában.

## CÉLKITŰZÉSEK

A jelen tanulmány két elkülönülő részből áll. A kutatás során emberi mintákat és egérmodellt egyaránt alkalmaztunk céljaink elérése érdekében. Ennek megfelelően a vizsgálat átfogó célja az alábbiak értékelése volt:

### *Egérmodell esetén:*

- az IVF-eljárással fogant hím egerek allergiás válaszokra való hajlamának vizsgálata a természetes úton fogant társaikkal összehasonlítva
- Az össz-IgE és az IL-4 szérumszintjének mérése IVF- és természetes úton fogant hím egerekben, ovalbuminnal (OVA) történő szenzitizáció előtt és után
- A testtömeg, valamint a tüdő és a lép tömegének mérése IVF- és természetes úton fogant egereknél, az OVA-val való szenzitizáció előtt és után

### *Emberi minta esetén a célok az alábbiak voltak:*

- A PD-1 és Tim-3 expressziójának, valamint a hozzájuk kapcsolódó miRNS-ek (miR-138, miR-155) vizsgálata RPL-ben (ismétlődő terhességvesztés) szenvedő nők perifériás vér mononukleáris sejtjeiben (PBMC)
- A PD-1 és TIM-3 fehérjék expressziójának mérése CD4+ és CD8+ T-sejteken RPL-es betegek és egészséges várandós nők összehasonlításában
- A PD-1 és TIM-3 génszintű (transzkripció) expressziójának vizsgálata PBMC-mintákban RPL-es nők és kontrollalanyok esetében
- A mir-138 és mir-155 transzkripció szintjének mérése a PBMC-kben RPL-es nők és kontrollcsoport összehasonlításában
- A TGF- $\beta$  és az IP-10 szérumszintjének meghatározása RPL-es nők és egészséges kontrollok vérébe.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Állatmodellek

Az egereken végzett kísérletekhez hathetes hím és nőstény CBA és B6 törzsű egereket vásároltunk a Charles River cégtől. A kísérlet ezen részét a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága és a Magyar Tudományos Állatkísérleti Etikai Bizottság jóváhagyta.

### In vitro megtermékenyítés (IVF) és természetes fogantatás

A CBA nőstény egerek 7,5 NE vemhes kancák szérum-gonadotropinját (PMSG), majd 48 óra múlva 7,5 NE humán choriongonadotropint (hCG) kaptak. A hCG injekciót követően 12–15 órával a petevezetékekből kumulusz–oocita komplexeket (COC) nyertünk ki boncolással.

Az IVF-eljárás során  $1 \times 10^5$  kapacitált spermiumsejtet adtunk a petesejtekhez KSOM táptalajban, és 37 °C-on 6 órán át inkubáltuk. A megtermékenyített zigótákat többszöri M2 közeges mosással tisztítottuk meg a felesleges spermiumoktól, törmeléktől és kumuluszsejtektől, majd paraffinolajjal fedett KSOM cseppbe helyeztük őket. Az embriókat 5%-os CO<sub>2</sub>-atmoszférában 37 °C-on tenyésztettük a blastocysta stádiumig. Egyidejűleg 7–10 blastocysta-stádiumú embriót ültettünk be az uterus mindkét oldalára. A beültetést követő 17. napon az újszülöttek természetes úton születtek meg.

Természetes fogantatáshoz 1–2 nőstény egeret párosítottunk egy hímmel. Másnap reggel ellenőriztük a hüvelydugók jelenlétét; a pozitív nőstényeket külön ketrecekben tartottuk a szülésig.

## **Ovalbumin által indukált gyulladásoos modell egerekben**

Az allergiás modell létrehozásához 8 hetes hím egereket intraperitoneálisan beoltottunk az 1. és 8. napon 20 µg ovalbuminnal (OVA), melyet 1 mg alumínium-hidroxiddal kevertünk 200 µl fiziológias sóoldatban. A 15., 16. és 17. napon az egereket intranazálisan újra beoltottuk 20 µg OVA-val (40 µl sóoldatban). A kontroll (NC) és IVF csoportok egerei azonos térfogatú fiziológias sóoldatot kaptak.

## **Kísérleti csoportok**

Az egereket négy csoportba osztottuk:

- Természetesen fogant, OVA-val nem kezelt (NC) (n = 8)
- Természetesen fogant, OVA-val szenzitizált (OVA-NC) (n = 13)
- IVF-fogant, OVA-val nem kezelt (IVF) (n = 8)
- IVF-fogant, OVA-val szenzitizált (OVA-IVF) (n = 13)

## **Test- és szervtömeg mérése egerekben**

Az egerek teljes testtömegét a leölés előtt mértük és rögzítettük. A 10 hetes egereket testsúly szerint párosítva, cervicalis diszlokációval altattuk el. A lépet és tüdőt eltávolítottuk, tömegüket mérleggel meghatároztuk és rögzítettük.

## **IgE és IL-4 szérumszint mérése egerekben**

A teljes IgE és IL-4 szérumkoncentrációkat ELISA-készletekkel határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. Az optikai denzitást 450 nm hullámhosszon mértük ELISA-leolvasóval.

## **Humán minták**

E tanulmány emberi részét a Tabrizi Orvostudományi Egyetem Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá. Mintákat 50 RPL-ben szenvedő nőtől (10–12. terhességi hét) és 50 egészséges, azonos terhességi korban lévő várandós nőtől gyűjtöttünk.

### **PBMC sejtek izolálása és tenyésztése RPL-es és kontroll alanyokból**

Mindkét csoportból 15 ml perifériás vért vettünk steril körülmények között, antikoagulánsként heparint adtunk hozzá. Ezt követően izoláltuk a perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC), majd áramlási citometriával meghatároztuk a PD-1 és Tim-3 kifejeződését CD4+ és CD8+ T-sejteken.

### **PD-1 és Tim-3 kimutatása áramlási citométerrel CD4+ és CD8+ T-sejteken**

A PBMC-k mosása után 1 millió sejtet 100 µl mosópufferbe szuszpendáltunk, és sötétben, 4 °C-on 60 percen át inkubáltuk specifikus monoklonális ellenanyagokkal:

- anti-CD4-FITC
- anti-PD-1-PerCp/Cy5.5
- anti-Tim-3-APC
- anti-CD8-PE

A PD-1 és Tim-3 receptorokat expresszáló CD4+ és CD8+ T-sejtek arányát FACS Calibur áramlási citométerrel mértük.

### **mRNS-expresszió elemzése**

A PBMC-sejtekből RNS-t izoláltunk Ytzol Pure RNS-kivonó készlettel. A PD-1 és Tim-3 mRNS-expresszióját RT-PCR-rel és CYBER Green Master Mix-szel vizsgáltuk. A relatív mRNS-szinteket β-aktinhoz viszonyítottuk. A mir-138 és mir-155 expresszióját Light Cycler 2.0 rendszerrel mértük RT-PCR segítségével.

## **TGF- $\beta$ és IP-10 szérumszint meghatározása RPL-es nőkben és kontrollokban**

A TGF- $\beta$  és IP-10 szinteket ELISA-készletekkel mértük. A kimutatási határ TGF- $\beta$  esetén 1 pg/ml, IP-10 esetén 2,5 pg/ml volt.

### **Statisztikai elemzés**

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 8 és SPSS szoftverrel végeztük. Az adatokat átlag  $\pm$  szórás (Mean  $\pm$  SD) formában adtuk meg. A csoportok közötti különbségek meghatározására független mintás t-próbát használtunk. A korrelációkat Pearson-féle korrelációs teszttel számoltuk. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az állatkísérletes csoportok közötti különbségekhez ANOVA-tesztet is alkalmaztunk, szintén  $p \leq 0,05$  határértékkel.

## EREDMÉNYEK

### **Össz-IgE szérumszint természetes úton és IVF-eljárással fogant egerekben**

Az IVF-fogant egerek alap (nem szenzitizált) IgE-szintje enyhén magasabb volt a természetes úton fogant egerekéhez képest. OVA-val történő szenzitizálás mind a természetes, mind az IVF-eljárással fogant egereknél szignifikáns emelkedést eredményezett a szérumszintben ( $p = 0,012$ , illetve  $p = 0,029$ ). Az OVA-kezelést követő IgE-szint-emelkedés erőteljesebben jelentkezett az IVF-fogant egerek esetében. Eredményeink azt is kimutatták, hogy az OVA-val kezelt IVF-fogant egerek (OVA-IVF) szérumszintje szignifikánsan magasabb volt, mint az OVA-val kezelt természetesen fogant egereké (OVA-NC) ( $p = 0,004$ ).

### **IL-4 szérumszint természetesen és IVF-fogant utódokban**

Az IVF-fogant egerek IL-4 alapszintje szignifikánsan magasabb volt a természetes úton fogant egerekéhez képest ( $p = 0,048$ ). Mind a természetes, mind az IVF-eredetű egerek esetében az OVA-szenzitizálás szignifikáns IL-4 szintnövekedést eredményezett a nem szenzitizált kontrollokhöz viszonyítva ( $p = 0,0148$ , illetve  $p = 0,0189$ ).

### **Testtömeg és szervtömeg mérése egerekben**

Az OVA injekciót követően a tüdő tömege mind természetes, mind IVF-fogant egerek esetében szignifikánsan megnőtt a kezeletlen csoportokhoz képest ( $p = 0,034$  és  $p = 0,013$ ). Az IVF-fogant nem szenzitizált (N-IVF) és OVA-szenzitizált (OVA-IVF) egerek tüdőtömege szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő természetes kontrollesoportoké (N-NC és OVA-NC) ( $p = 0,0335$ , illetve  $p = 0,001$ ).

### ***Tüdőtömeg alakulása***

A tüdőtömeget testtömegarányosan is értékeltük, úgy, hogy a tüdő tömegét megszoroztuk 100-zal, majd elosztottuk az egér teljes testtömegével. Az eredmények szerint az

OVA-szenzitizálás hatására a tüdőindex értéke megnövekedett mindkét származási csoportban (természetes: 0,76 vs. 0,625; IVF: 0,88 vs. 0,68). Az emelkedés kifejezettebb volt az IVF-fogant egereknél.

### ***Léptömeg alakulása***

Az OVA injekció hatására mind a természetes úton, mind az IVF-fogant egerek léptömege szignifikánsan megnőtt a nem kezelt csoportokhoz viszonyítva ( $p = 0,007$  és  $p = 0,008$ ). Továbbá, az N-IVF egerek léptömege is magasabb volt az N-NC csoporthoz képest ( $p = 0,013$ ). Az OVA-val kezelt IVF-fogant egerek (OVA-IVF) léptömege szignifikánsan magasabb volt az OVA-NC egerekéhez képest is ( $p = 0,041$ ).

### **CD4+ és CD8+ T-sejtek PD-1 és Tim-3 expressziója RPL-es betegeknél és kontrollszemélyeknél**

#### ***PD-1 és Tim-3 felszíni expressziója CD4+ és CD8+ T-sejteken***

A CD4+ és CD8+ T-sejtek felszínén megjelenő PD-1 és Tim-3 fehérjék expresszióját háromszínű áramlási citometriával határoztuk meg. Az immunfenotipizálás eredményei szerint az RPL-es betegeknél szignifikánsan alacsonyabb arányban fordultak elő PD-1-et expresszáló CD4+ és CD8+ T-sejtek, mint az egészséges kontrolloknál.

A CD8+ T-sejteken Tim-3 expressziója szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoportban, mint az RPL-es betegeknél.

A CD4+ T-sejtek Tim-3 expressziója tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között.

### ***PD-1 és Tim-3 mRNS-expressziója RPL-es betegek és kontrollok PBMC-sejtjeiben***

Az RPL-ben szenvedő páciensek perifériás vér mononukleáris sejtjeiben (PBMC) a PD-1 és Tim-3 gének mRNS-szintje csökkent volt a kontrollcsoporthoz képest, azonban a Tim-3 esetében ez a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak.

### **TGF- $\beta$ és IP-10 szérumszint RPL-es és kontroll alanyokban**

A TGF- $\beta$  szérumszintje az RPL-es betegeknél ( $25,11 \pm 15,08$  pg/ml) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges kontrollcsoportban ( $36,78 \pm 21,96$  pg/ml).

Ezzel szemben az IP-10 szérumszint az RPL-es betegeknél ( $210,7 \pm 123,5$  pg/ml) szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a kontrolloknál ( $143,1 \pm 81,76$  pg/ml).

### **Kapcsolat a Tim-3 expresszió és a citokinszintek között**

A Tim-3 expressziója mind CD4+, mind CD8+ T-sejteken pozitív korrelációt mutatott a TGF- $\beta$  szinttel:

- CD4+ T-sejteken:  $r = 0,3526$ ;  $p = 0,0120$
- CD8+ T-sejteken:  $r = 0,4514$ ;  $p = 0,0010$

Ugyanakkor negatív korreláció állt fenn a Tim-3 expresszió és az IP-10 szint között:

- CD4+ T-sejteken:  $r = -0,3229$ ;  $p = 0,0222$
- CD8+ T-sejteken:  $r = -0,3929$ ;  $p = 0,0048$

### **mir-138 és mir-155 transzkripció szintje RPL-es betegeknél és kontrolloknál**

A mir-138 és mir-155 relatív expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az RPL-es páciensek PBMC-sejtjeiben, mint az egészséges várandós nőkben.

A korrelációs elemzés a következő összefüggéseket tárta fel:

- mir-155 és PD-1 expresszió között: pozitív korreláció ( $r = 0,3933$ ;  $p = 0,0047$ )
- mir-138 és PD-1 expresszió között: pozitív korreláció ( $r = 0,4562$ ;  $p = 0,0009$ )
- mir-138 és Tim-3 expresszió között: gyenge pozitív korreláció, statisztikailag nem szignifikáns ( $r = 0,1172$ ;  $p = 0,4176$ )
- mir-155 és Tim-3 expresszió között: szignifikáns pozitív korreláció ( $r = 0,3329$ ;  $p = 0,0182$ )

## MEGBESZÉLÉS

Az in vitro megtermékenyítést (IVF) a női és férfi eredetű meddőségi problémák leküzdésére alkalmazzák. Évente körülbelül 200 000 gyermek születik asszisztált reprodukciós technológiák (ART) alkalmazásával világszerte, ami a fejlett országokban fogant babák mintegy 5%-át teszi ki (1). Az ART iránti kereslet növekedésével párhuzamosan fokozódtak az aggályok az ilyen módon fogant gyermekek hosszú távú egészségi állapotát illetően. A lehetséges egészségügyi kockázatok háttérben álló mechanizmusokat még pontosítani kell. Számos tanulmány igazolta az összefüggést az ART és az imprinting-zavarok között.

Korábbi kutatások értékelték az immunrendszer működésének megváltozását, valamint az immunológiai betegségek megnövekedett előfordulását az ART-tal fogant utódokban.

Előző vizsgálatunkban kimutattuk, hogy az ART-tal fogant egerek kevésbé hatékony immunválaszt mutattak a BCG-oltásra, mivel immunrendszerük a Th2- és Th17-domináns válaszok irányába tolódott (6). Mivel a Th2- és Th17-túlsúly jellemző lehet allergiák, autoimmun betegségek és gyulladásozó állapotok esetén, az ART-tal fogant utódok nagyobb eséllyel lehetnek hajlamosak allergiás és gyulladásozó immunreakciók kialakulására (28).

Állatkísérletes eredményeink azt mutatták, hogy az OVA-val történő szenzitizálás (mind természetesen, mind IVF-fogant egerek esetén) allergiás reakciót váltott ki, amelyet a szérum IgE és IL-4 szintjének emelkedése, valamint a lép és tüdő tömegének növekedése jelzett. Korábbi kutatások szerint az OVA-val való immunizálás IgE-mediált splenocytá-proliferációt és Th2-domináns immunválaszt vált ki (29). Emellett OVA-szenzitizált egerekben kifejezettebb gyulladásozó reakció alakul ki a légutakban (30).

Az OVA-indukálta gyulladásozó válaszokat összehasonlítva a négy kísérleti csoport között megállapítható, hogy az IVF-eljárás valószínűleg fokozott allergiás reakciókra való

hajlamot eredményez az utódokban, amit az IgE- és IL-4 szérumszintek emelkedése, valamint a tüdő és lép megnövekedett tömege is alátámaszt az IVF-fogant egereknél.

Az IVF-folyamat során bármilyen változás – legyen szó a felhasznált anyagokról (pl. műanyag, fém, üveg), a mikrokörnyezeti feltételekről (tenyésztőközeg, inkubátor, oxigén, széndioxid, légköri viszonyok) – káros hatással lehet az ivarsejtekre és az embrió minőségére, ezáltal növelve a genetikai eltérések arányát (1,31).

Egészséges terhesség során az immunrendszer szigorúan szabályozott, hogy képes legyen elfogadni a félidegen (semi-allogén) magzatot, miközben védi az anyát és az embriót a kórokozóktól. Ezért, ha az immunadaptáció hiányos, az hozzájárulhat az ismétlődő vetélés (RPL) patomechanizmusához (32).

A Tim-3 és PD-1 receptorok ligandjai, a Galectin-9 és PD-L1 normál terhesség során megemelkednek, és közvetítő szerepet játszhatnak az anyai immunológiai tolerancia fenntartásában a magzat irányába. A PD-1 mRNS expressziója a PBMC-sejtekben, valamint a PD-1 fehérje expressziója a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejtek felszínén csökkent volt RPL-ben szenvedő nőknél (33,34). Eredményeink szerint a Tim-3 mRNS expressziója is szignifikánsan csökkent ezeknél a betegeknél, különösen a perifériás CD8<sup>+</sup>, de nem CD4<sup>+</sup> T-sejteken.

A miRNS-ek, mint a génexpresszió szabályozói, befolyásolják az endometriális receptivitást azáltal, hogy hatással vannak az angiogenezisre, energia-anyagcserére, sejtosztódásra, decidualizációra és a helyi citokinegyensúlyra (27). Kutatásunkban jelentős csökkenést találtunk a miR-138 és miR-155 expressziójában az RPL-es betegek PBMC-sejtjeiben, továbbá pozitív korrelációt mutattunk ki miR-155 és PD-1 expressziója között.

A TGF- $\beta$  központi szerepet játszik az embrió beágyazódása során az endometriális receptivitás szabályozásában (35). Emellett hozzájárul a Treg sejtek differenciálódásához, mivel TGF- $\beta$  jelátvitel hiányában CD4<sup>+</sup> T-sejtek nem képesek Treg sejtekké alakulni sem in

vitro, sem in vivo. Kimutattuk, hogy a TGF- $\beta$  szérumszint szignifikánsan alacsonyabb az RPL-es nőknél az egészséges kontrollokhhoz képest. Ez összhangban áll más vizsgálatokkal, amelyek a decidua TGF- $\beta$ 1 expressziójának csökkenését írták le RPL-ben (36).

Megfigyelések szerint a magas IP-10 szint is kapcsolatban állhat terhességgel összefüggő kóros folyamatokkal. Eredményeink szerint az IP-10 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az RPL-es nők szérumában, és negatív korrelációt találtunk a Tim-3 és PD-1 expresszió (CD4+ és CD8+ T-sejteken) és az IP-10 szérumszint között. Bár az IP-10-hez kapcsolódó gyulladás szükséges lehet az implantáció és a szülés során, a túlzott gyulladás komplikációkat okozhat a terhességben.

### **Összegzésként**

- Az RPL-ben szenvedő nőknél csökkent PD-1 és Tim-3 mRNS-expressziót figyeltünk meg a PBMC-sejtekben
- A Tim-3 és PD-1 fehérjék expressziója szintén alacsonyabb volt a CD8+ T-sejteken
- Jelentősen csökkent miR-138 és miR-155 expressziót tapasztaltunk
- A TGF- $\beta$  szintje szignifikánsan alacsonyabb, míg az IP-10 szintje magasabb volt az RPL-es nők szérumában, mint a kontrolloknál.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni őszinte hálámat mindazoknak, akik jelentős szerepet játszottak a doktori tanulmányaim során.

Elsőként szeretném kifejezni mély tiszteletteljes köszönetemet néhai témavezetőmnek, Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júliának. Kiemelkedő tudományos felkészültsége, valamint az a rendíthetetlen elkötelezettsége, amellyel a fiatal kutatókat támogatta, példaértékűvé tette őt az akadémiai élet sokszor versengő világában. Útmutatása és bátorítása felbecsülhetetlen volt számomra. Emléke örökké velem marad.

Szívből hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Bognár Zoltánnak, aki nagyvonalúan osztotta meg velem széleskörű tudományos ismereteit, és kulcsszerepet játszott abban, hogy elindulhassak az akadémiai pályán.

Köszönetet mondok Dr. Bugyi Beátának, az Orvosi Biológiai Intézet vezetőjének a doktori tanulmányaim során nyújtott támogatásáért.

Hálás vagyok kollégáimnak, Csabai-Tanics Tímeának és Görgey Évának, akik segítségükkel és a kellemes munkakörnyezet megteremtésével hozzájárultak munkámhoz.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak a feltétel nélküli támogatást, amellyel végig kísérték ezen az úton.

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Ahmadi, H., Aghebati-Maleki, L., Rashidiani, S., Csabai, T., Nnaemeka, O. B., & Szekeres-Bartho, J. (2023). Long-term effects of ART on the health of the offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(17), 13564.
2. Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jiménez, A., Pérez-Crespo, M., Ramírez, M. A., et al. (2004). Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(16), 5880–5885.
3. El Hajj, N., & Haaf, T. (2013). Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: Implications for human assisted reproduction. *Fertility and Sterility*, *99*(3), 632–641.
4. Hargreave, M., Jensen, A., Toender, A., Andersen, K. K., & Kjaer, S. K. (2013). Fertility treatment and childhood cancer risk: A systematic meta-analysis. *Fertility and Sterility*, *100*, 150–161.
5. Wang, L.-Y., Wang, N., Le, F., Li, L., Lou, H.-Y., Liu, X.-Z., et al. (2015). Superovulation induced changes of lipid metabolism in ovaries and embryos and its probable mechanism. *PLoS ONE*, *10*, e0132638.
6. Ahmadi, H., Fathi, F., Karimi, H., Amidi, F., Mehdinejadani, S., Moeini, A., et al. (2020). Altered TH1, TH2, TH17 balance in assisted reproductive technology conceived mice. *Journal of Reproductive Immunology*, *139*, 103117.
7. Karimi, H., Mahdavi, P., Fakhari, S., Faryabi, M. R., Esmacili, P., Banafshi, O., et al. (2017). Altered helper T cell-mediated immune responses in male mice conceived through in vitro fertilization. *Reproductive Toxicology*, *69*, 196–203.

8. Cui, L., Zhou, W., Xi, B., Ma, J., Hu, J., Fang, M., et al. (2020). Increased risk of metabolic dysfunction in children conceived by assisted reproductive technology. *Diabetologia*, *63*, 2150–2157.
9. Pawankar, R. (2014). Allergic diseases and asthma: A global public health concern and a call to action. *World Allergy Organization Journal*, *7*, 12.
10. Reese, S. E., Xu, C.-J., Den Dekker, H. T., Lee, M. K., Sikdar, S., Ruiz-Arenas, C., et al. (2019). Epigenome-wide meta-analysis of DNA methylation and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *143*, 2062–2074.
11. Schroeder, J. T., Bieneman, A. P., Chichester, K. L., Hamilton, R. G., Xiao, H., Saini, S. S., & Liu, M. C. (2010). Decreases in human dendritic cell-dependent TH2-like responses after acute in vivo IgE neutralization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*, 896–901.e6.
12. Gandhi, N. A., Bennett, B. L., Graham, N. M. H., Pirozzi, G., Stahl, N., & Yancopoulos, G. D. (2016). Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, *15*, 35–50.
13. Romagnani, S. (2000). The role of lymphocytes in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *105*, 399–408.
14. Sabouri, S., Lavasidis, G., Efstathiadou, A., Papisavva, M., Bellou, V., Bergantini, H., et al. (2021). Association between childhood asthma and history of assisted reproduction techniques: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Pediatrics*, *180*, 2007–2017.
15. Ericson, A., Nygren, K., Olausson, P., & Källén, B. (2002). Hospital care utilization of infants born after IVF. *Human Reproduction*, *17*, 929–932.

16. Li, Y. H., & Marren, A. (2018). Recurrent pregnancy loss: A summary of international evidence-based guidelines and practice. *Australian Journal of General Practice*, 47(7), 432–436.
17. La, X., Wang, W., Zhang, M., & Liang, L. (2021). Definition and multiple factors of recurrent spontaneous abortion. In *Recurrent Spontaneous Abortion* (pp. 231–257).
18. Huang, N., Chi, H., & Qiao, J. (2020). Role of regulatory T cells in regulating fetal-maternal immune tolerance in healthy pregnancies and reproductive diseases. *Frontiers in Immunology*, 11, 2068.
19. Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., Blaser, K., et al. (2003). IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *European Journal of Immunology*, 33(5), 1205–1214.
20. Díaz-Hernández, I., Alecsandru, D., García-Velasco, J. A., & Domínguez, F. (2021). Uterine natural killer cells: From foe to friend in reproduction. *Human Reproduction Update*, 27(4), 720–746.
21. Li, W., Xu, X., & Jin, L. (2021). Regulation of the innate immune cells during pregnancy: An immune checkpoint perspective. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(22), 10362–10375.
22. Hastings, W. D., Anderson, D. E., Kassam, N., Koguchi, K., Greenfield, E. A., Kent, S. C., et al. (2009). TIM-3 is expressed on activated human CD4<sup>+</sup> T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *European Journal of Immunology*, 39(9), 2492–2501.
23. Sun, J., Yang, M., Ban, Y., Gao, W., Song, B., Wang, Y., et al. (2016). Tim-3 is upregulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in Galectin-9 dependent pathway. *PLoS ONE*, 11(1), e0147186.

24. Li, W., Xu, X., & Jin, L. (2021). Regulation of the innate immune cells during pregnancy: An immune checkpoint perspective. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(22), 10362–10375.
25. Thai, T. H., Calado, D. P., Casola, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Xue, Y., et al. (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*, 316(5824), 604–608.
26. Vigorito, E., Perks, K. L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., et al. (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, 27(6), 847–859.
27. Wu, H. M., Lo, T. C., Tsai, C. L., Chen, L. H., Huang, H. Y., Wang, H. S., et al. (2022). Extracellular vesicle-associated microRNA-138-5p regulates embryo implantation and early pregnancy by adjusting GPR124. *Pharmaceutics*, 14(6), 1172.
28. Karimi, H., Mahdavi, P., Fakhari, S., Faryabi, M. R., Esmaeili, P., Banafshi, O., et al. (2017). Altered helper T cell-mediated immune responses in male mice conceived through in vitro fertilization. *Reproductive Toxicology*, 69, 196–203.
29. Sun, L. Z., Elsayed, S., Aasen, T. B., Van Do, T., Aardal, N. P., & Florvaag, E. (2010). Comparison between ovalbumin and ovalbumin peptide 323-339 responses in allergic mice: Humoral and cellular aspects. *Scandinavian Journal of Immunology*, 71(5), 329–335.
30. Warren, K. J., Dickinson, J. D., Nelson, A. J., Wyatt, T. A., Romberger, D. J., & Poole, J. A. (2019). Ovalbumin-sensitized mice have altered airway inflammation to agriculture organic dust. *Respiratory Research*, 20(1), 51.
31. Hart, R., & Norman, R. J. (2013). The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I – General health outcomes. *Human Reproduction Update*, 19(3), 232–243.

32. Huang, N., Chi, H., & Qiao, J. (2020). Role of regulatory T cells in regulating fetal-maternal immune tolerance in healthy pregnancies and reproductive diseases. *Frontiers in Immunology*, *11*, 2068.
33. Zhang, Y., Ma, L., Hu, X., Ji, J., Mor, G., & Liao, A. (2019). The role of the PD-1/PD-L1 axis in macrophage differentiation and function during pregnancy. *Human Reproduction*, *34*(1), 25–36.
34. Mohamed Khosroshahi, L., Parhizkar, F., Kachalaki, S., Aghebati-Maleki, A., & Aghebati-Maleki, L. (2021). Immune checkpoints and reproductive immunology: Pioneers in the future therapy of infertility-related disorders? *International Immunopharmacology*, *99*, 107935.
35. Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., & Chen, W. (2008). A critical function for TGF- $\beta$  signaling in the development of natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology*, *9*(6), 632–640.
36. Qian, J., Zhang, N., Lin, J., Wang, C., Pan, X., Chen, L., et al. (2018). Distinct pattern of Th17/Treg cells in pregnant women with a history of unexplained recurrent spontaneous abortion. *Bioscience Trends*, *12*(2), 157–167.

## TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

**Összesített impakt faktor: 23.5**

**Az értekezés alapjául szolgáló publikációk impakt faktora: 13.1**

**Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények:**

**Ahmadi Hamid**, Zoltan Bogнар, Timea Csabai-Tanics, Basil Nnaemeka Obodo, and Julia Szekeres-Bartho. 2024. "Allergic Disposition of IVF-Conceived Mice" *International Journal of Molecular Sciences* 25, no. 23: 12993.

**IF: 4.9**

**Ahmadi H.**, Soltani-Zangbar, M.S., Yousefi, M., Baradaran, B., Bromand, S., Aghebati Maleki, L., Szekeres-Bartho, J., 2024. The evaluation of PD-1 and Tim-3 expression besides their related miRNAs in PBMCs of women with recurrent pregnancy loss. *Immunol. Lett.* 266, 106837.

**IF: 3.3**

**Ahmadi Hamid**, Leili Aghebati-Maleki, Shima Rashidiani, Timea Csabai, Obodo Basil Nnaemeka, and Julia Szekeres-Bartho. 2023. "Long-Term Effects of ART on the Health of the Offspring" *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 17: 13564.

**IF: 4.9**

**Egyéb közlemények:**

E. Komijani, F. Parhizkar, S. Abdolmohammadi-Vahid, **H. Ahmadi**, N. Nouri, M. Yousefi, et al., Autophagy-Mediated Immune System Regulation in Reproductive System and Pregnancy-Associated Complications, *J. Reprod. Immunol.* 158 (2023) 103973.

**IF:2.9**

Ahmadi Y, **Ahmadi H**, Aghebati-Maleki L. Increase in the specificity of immunoassay methods by direct targeting different epitopes; sequential chain reactions. *Human Antibodies*. 2024;32(4):181-186.

**IF:-**

**Ahmadi Hamid**; Csabai, T.; Gorgey, E.; Rashidani, S.; Parhizkar, F.; Aghebati-Maleki, L. Composition and effects of seminal plasma in the female reproductive tracts on implantation of human embryos. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, 151, 113065.

**IF: 7.5**