

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating  
polypeptide*) hatása a reprodukcióra**

PhD értekezés

Török Dóra

2024

Témavezetők:

.....

**Dr. Cseh Sándor**

Állatorvostudományi Egyetem

Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika

témavezető

.....

**Dr. Somoskői Bence**

Állatorvostudományi Egyetem

Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika

témavezető

Készült 8 példányban. Ez a ..... sz. példány

.....

Török Dóra

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
<b>1</b> <b>Összefoglalás</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b> <b>Summary</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b> <b>Bevezetés</b> .....	<b>12</b>
<b>4</b> <b>Irodalmi áttekintés</b> .....	<b>13</b>
<b>4.1</b> <b>A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)</b> .....	<b>13</b>
4.1.1 A PACAP felfedezése.....	13
4.1.2 A PACAP előfordulása .....	14
4.1.3 A PACAP előfordulása a szervezetben.....	14
4.1.4 A PACAP élettani hatásai .....	16
4.1.5 A PACAP élettani jelentősége a reproduktív szervekben.....	17
<b>4.2</b> <b>Asszisztált reprodukciós eljárások során használt vizsgálati módszerek</b> .....	<b>21</b>
4.2.1 Preimplantációs embriók minőségvizsgálata .....	21
4.2.2 Implantáció folyamata, beágyazódásra ható növekedési faktorok előfordulása és szerepük a szervezetben.....	23
4.2.3 Krioprezerváció és hatása a sejtekre .....	25
4.2.4 A spermium felépítése, gyakoribb morfológiai rendellenességek .....	27
<b>5</b> <b>Célkitűzések</b> .....	<b>29</b>
<b>6</b> <b>Kísérleti állatok tartási körülményei</b> .....	<b>31</b>
<b>7</b> <b>Endogén PACAP hatásának vizsgálata a nőstények reprodukciójára</b> .....	<b>32</b>
<b>7.1</b> <b>PACAP hatása a ciklusra</b> .....	<b>32</b>
7.1.1 Anyag és módszer.....	32
7.1.2 Eredmények .....	34
<b>7.2</b> <b>PACAP hatása a preimplantációs embriók fejlődésére</b> .....	<b>35</b>
7.2.1 Anyag és módszer .....	35
7.2.2 Eredmények .....	37
<b>7.3</b> <b>PACAP hatása az implantáció esélyére</b> .....	<b>39</b>
7.3.1 Anyag és módszer.....	39
7.3.2 Eredmények .....	44
<b>8</b> <b>Endogén PACAP hatásának vizsgálata a hímek reprodukciójára</b> .....	<b>48</b>
<b>8.1</b> <b>PACAP hatása a spermiumok motilitására és morfológiájára</b> .....	<b>48</b>
8.1.1 Anyag és módszer.....	48
8.1.2 Eredmények .....	50
<b>9</b> <b>Megbeszélés</b> .....	<b>52</b>

<b>10</b>	<b>Exogén PACAP felhasználási lehetőségei az asszisztált reprodukciós eljárások során</b>	<b>55</b>
10.1	Exogén PACAP hatása a preimplantációs embriók minőségére az <i>in vitro</i> embriótenyésztés során	55
10.1.1	Anyag és módszer	55
10.1.2	Eredmények	56
10.2	Exogén PACAP hatása a vitrifikáció utáni túlélésre és továbbfejlődésre	56
10.2.1	Anyag és módszer	56
10.2.2	Eredmények	59
10.3	Exogén PACAP hatása az implantációs esélyre	60
10.3.1	Anyag és módszer	60
10.3.2	Eredmények	61
10.4	Exogén PACAP hatása a spermiumok mélyhűtése során	61
10.4.1	Anyag és módszer	61
10.4.2	Eredmények	63
<b>11</b>	<b>Megbeszélés</b>	<b>65</b>
<b>12</b>	<b>Új tudományos eredmények</b>	<b>69</b>
<b>13</b>	<b>Irodalom</b>	<b>70</b>
<b>14</b>	<b>A doktori kutatás eredményeinek közlései</b>	<b>101</b>
14.1	Lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk	101
14.2	Konferencia közlemények	101
14.3	A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk	103
<b>15</b>	<b>Köszönetnyilvánítás</b>	<b>106</b>

## Rövidítések jegyzéke

<b>ACSA</b>	adenilát cikláz stimuláló aktivitás
<b><i>Adcyap1</i></b>	PACAP-ot kódoló gén
<b><i>Adcyap1r</i></b>	PACAP 1. típusú receptort kódoló gén
<b>Bad</b>	Bcl-2 agonist of cell death
<b>Bax</b>	Bcl-2-associated X protein
<b>Bcl</b>	B-sejtes limfóma
<b>Bcl-2</b>	B-sejtes limfóma 2
<b>Bcl-xL</b>	extra nagy B-sejtes limfóma
<b>cAMP</b>	ciklikus adenzin-monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
<b>CASA</b>	Computer-asszisztált sperma analízis
<b>cDNS</b>	komplementer-dezoxiribonukleinsav (complementer deoxyribonucleic acid)
<b>CPA</b>	krioprotektáns anyag
<b>CRH</b>	kortikotropinfelszabadító hormon
<b>Ct</b>	küszöbciklus (Threshold cycle)
<b>DMSO</b>	dimetil-szulfoxid
<b>DSS</b>	dextrán- szulfát-nátrium
<b>eCG</b>	kanca choriogonadotropin (equine chorionic gonadotropin)
<b>EG</b>	etilén-glikol
<b>EGFR</b>	epidermális növekedési faktor receptor
<b>EM</b>	Equilibrációs Médium
<b>ErbB4</b>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 4
<b>ERK</b>	extracelluláris szignál szabályozott-kináz
<b>FBS</b>	magzati szarvasmarha-szérum (fetal bovine serum)
<b>FSH</b>	follikuluszstimuláló hormon
<b><i>Gapdh</i></b>	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenázt kódoló gén
<b>GHRH</b>	növekedési hormon felszabadító hormon
<b>GnRH</b>	gonadotropinfelszabadító hormon
<b><i>Hbegf</i></b>	HB-EGF-et kódoló gén
<b>HB-EGF</b>	heparin binding epidermal growth factor - like growth factor
<b>hCG</b>	humán choriogonadotropin
<b>ICM</b>	embriócsomó
<b>JNK</b>	Jun N-terminális-kináz
<b>KO</b>	génhiányos (knock-out)
<b>LH</b>	luteinizáló hormon
<b>LME</b>	általános lineáris kevert modell

<b>MAPK</b>	mitogén aktivált protein-kináz
<b>mRNS</b>	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
<b>OPS</b>	open pulled straw
<b>p38MAPK</b>	p38 mitogén aktivált protein-kináz
<b>PAC1R</b>	PACAP 1. típusú receptor
<b>PACAP</b>	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)
<b>PACAP KO</b>	PACAP génhányos (knock-out)
<b>PACAP27</b>	PACAP 27 aminosavból álló formája
<b>PACAP38</b>	PACAP 38 aminosavból álló formája
<b>PBS</b>	foszfát pufferes sóoldat (phosphate buffered saline)
<b>PFA</b>	paraformaldehid
<b>PI</b>	propidium-jodid
<b>PKA</b>	protein-kináz A
<b><i>Ptgs2</i></b>	prostaglandin-endoperoxid-szintáz kódoló gén
<b>qPCR</b>	kvantitatív real-time polimeráz-lánreakció (quantitative real-time polymerase chain reaction)
<b>RIA</b>	radioimmunoassay
<b>ROS</b>	reaktív oxigéngyök
<b>SM</b>	szukróz médium
<b>TM</b>	tenyésztő médium
<b>TRH</b>	tireotropinfelszabadító hormon
<b>VIP</b>	vazoaktív intesztinális peptid
<b>WHO</b>	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
<b>ZP</b>	zona pellucida

## 1 Összefoglalás

Az hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) a vazóaktív intesztinális peptid (VIP)/szekretin/glükagon szupercsaládba tartozó neuropeptid. A PACAP aminosav-szekvenciái a különböző gerincesekben 84-100%-os azonosságot mutatnak. Erős konzerváltsága arra utal, hogy a PACAP fontos élettani folyamatokban vesz részt. Szerepet játszik az értágításban, az immunmodulációban, a citoprotekcióban és a gasztrointesztinális, kardiovaszkuláris, légzőszervi és reprodukciós folyamatok szabályozásában. Szabályozza többek között az inzulinszekréción, a sejtciklust, a differenciálódást és a sejthalált. A PACAP hiánya knock-out (KO) állatokban számos biokémiai és patofiziológiai elváltozáshoz vezet, ide tartozik az endokrin zavarok és gyulladásszerű állapotok kialakulása. Az ivarszervekben észlelt nagy mennyisége hívta fel a figyelmet arra, hogy a PACAP központi szerepet játszhat a szaporodásbiológiai folyamatokban is. Megfigyelték, hogy több szinten is befolyásolja a termékenységet és a reprodukciót. Autokrin és parakrin folyamat révén hatással van a gonadotrop hormonok termelésére és kibocsátására, expressziója differenciáltan szabályozott a ciklus során és fontos szerepet játszik a preantrális folliculusok növekedésének és differenciációjának szabályozásában. Valamint PACAP génhányos egereken végzett vizsgálatokban alacsonyabb implantációs rátát figyeltek meg.

A fenti irodalmi adatok alapján szerettük volna megvizsgálni szerepét a reprodukció különböző szintjein, valamint és antiapoptotikus hatását kihasználva megvizsgálni, hogy a külsőleg adagolt PACAP előnyösen befolyásolja-e az asszisztált reprodukciós eljárások sikerességét. Megvizsgáltuk az endogén PACAP hatását a nőstények ciklusára, a preimplantációs embriók fejlődésére és az implantáció esélyére (egy beágyazódásra ható növekedési faktor, a HB-EGF génexpressziójának mérésével), valamint hímek esetében a spermiumok motilitására és morfológiájára. Exogén PACAP esetében megnéztük hatását az *in vitro* embriótenyésztés, embriók vitrifikációja, valamint spermiumok mélyhűtése során. Vizsgálataink többségéhez az egeret választottuk modellállatnak. Kísérleteinket BDF1 egértörzs 10-12 hetes egyedek, valamint CD1 egértörzs 10-12 hetes vad típusú (PACAP-pal rendelkező, kontroll) és PACAP KO (génkiütött) egyedek végeztük. Az exogén PACAP spermiumok mélyhűtése során való alkalmazhatóságának vizsgálatát a nagyobb volumen és a kevésbé invazív beavatkozás miatt kutyák ivartalanításából származó mellékherékből nyert spermiumokon végeztük.

Nőstények ösztrociklusának vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú és PACAP KO egerek hormontermelése között. Preimplantációs embriófejlődésre gyakorolt hatásánál megfigyeltük a génhányos embriók magasabb DNS fragmentációját. Génexpressziós mérések során, a vemhesség 4. napján szignifikánsan nagyobb volt az

embrióval rendelkező, vemhes nőstények méhszöveti *Adcyap1* (PACAP-ot kódoló gén) és *Hbegf* (HB-EGF-t kódoló gén) relatív expressziója. Továbbá PACAP esetében szignifikáns kapcsolatot találtunk a méhszöveti expresszió és az embriók fejlettsége között. A nőstény méhszöveti expressziójának 0,001-gyel való emelkedésével 3,92-szer nagyobb eséllyel fordulnak elő blasztociszta fejlettségű embriók. HB-EGF esetében pedig szignifikánsan magasabb expressziót mértünk az egyre fejlettebb embriókban, ugyanakkor a méhszöveti expressziós szint nem befolyásolta az embriók fejlettségi állapotát. Ezen felül, korrelációt találtunk a méhszöveti és embrionális expressziós szintek között. A korrelációs együtthatókból gyenge pozitív kapcsolat látszik, mind az *Adcyap1* és a *Hbegf* szöveti relatív expressziója között, mind pedig a *Hbegf* méhszöveti és az embriók *Hbegf* relatív expressziója között, ugyanakkor az *Adcyap1* szöveti és az embriók *Hbegf* relatív mRNS szintje közötti korrelációs együttható nem különbözik szignifikánsan a nullától.

PACAP KO és vad típusú hímeken végzett vizsgálataink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget sem a spermiumok motilitásában sem a morfológiában.

Embriók esetében az exogén PACAP *in vitro* alkalmazása során szignifikánsan csökkent a DNS fragmentáció a 8  $\mu$ M PACAP-pal kezelt csoportban a kontrollhoz képest. Mélyhűtés során való alkalmazásakor a 2  $\mu$ M PACAP-pal (EM2) kezelt csoport esetében szignifikánsan nagyobb továbbfejlődési arányt tapasztaltunk a felolvasztást követő 24 órában a vitrifikált kontrollhoz képest, valamint magasabb *Hbegf* expressziót figyeltünk meg a friss embriókhoz képest.

A PACAP spermiumok mélyhűtése során való alkalmazásakor a 4  $\mu$ M illetve 8  $\mu$ M PACAP-pal kezelt csoportban nem volt szignifikáns eltérés a friss spermiumok motilitásához képest, míg a kontroll és 2  $\mu$ M esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A normál morfológiát, és az akroszóma reakciót mutató spermiumok tekintetében nem volt szignifikáns különbség az egyes csoportok között.

Fenti vizsgálataink alapján tehát megállapítottuk, hogy az endogén PACAP-nak citoprotektív szerepe van a preimplantációs embriófejlődés során a DNS fragmentációval szemben, pozitív hatással van a preimplantációs embrió minőségére, hiányában a mikronukleuszok aránya nő, mely csökkenti az implantációs képességet. Feltehetően serkentő hatással van a preimplantációs embriók fejlődésére, erre utalhat, hogy méhszöveti génexpressziójának növekedésével növekszik a fejlettebb embriók előfordulási esélye. A preimplantációs embriók fejlődésére gyakorolt pozitív hatást az exogén PACAP preimplantációs embrió tenyésztése során való alkalmazásával is igazoltuk. Az exogén PACAP preimplantációs embrió tenyésztése során való alkalmazása javítja az embriók



minőségét, csökkenti a DNS fragmentációt és sejtvédő anyagként való alkalmazása mind embrió, mind spermium esetében dóziszfüggő módon emeli a krioprezerváció utáni túlélést.

## 2 Summary

The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide belonging to the vasoactive intestinal peptide (VIP)/secretin/glucagon superfamily. The amino acid sequences of PACAP show 84-100% identity in different vertebrates. Its high conservation suggests that PACAP is involved in important physiological pathways. It plays a role in vasodilation, immunomodulation, cytoprotection and regulation of gastrointestinal, cardiovascular, respiratory, and reproductive processes. It also regulates insulin secretion, cell cycle, differentiation, and cell death. The absence PACAP in knock-out (KO) animals leads to a variety of biochemical and pathophysiological abnormalities, including endocrine disruption and inflammation. The high levels of PACAP found in the reproductive organs have suggested that PACAP may also play a central role in reproduction. It has been observed to affect fertility and reproduction at several levels. It affects the production and release of gonadotropic hormones through an autocrine and paracrine process, its expression is differentially regulated during the cycle, and it plays an important role in regulating of the growth and differentiation of preantral follicles. Lower implantation rates have been observed in studies using PACAP gene-deficient mice.

Based on the above literature data, we wanted to investigate its role at different levels of reproduction and to test whether externally administered PACAP has a beneficial effect on the success of assisted reproductive techniques by exploiting its anti-apoptotic effect. We studied the effects of endogenous PACAP on the female cycle, preimplantation embryo development and implantation probability (by measuring the gene expression of an implantation growth factor, HB-EGF), and on sperm motility and morphology in males. In the case of exogenous PACAP, its effects were examined during *in vitro* embryo culture, embryo vitrification and sperm cryopreservation. Mice were chosen as the model animal for most of our studies. Our experiments were performed on 10-12 week old BDF1 mice and on 10-12 week old wild type (PACAP control) and PACAP KO (gene knock-out) CD1 mice. The feasibility of using exogenous PACAP for cryopreservation of spermatozoa was tested using spermatozoa obtained from the epididymides of castrated dogs due to the higher volume and less invasive procedure.

When examining the estrous cycle of females, we found no significant difference in hormone production between wild-type and PACAP KO mice. In terms of the effect on preimplantation embryo development, we observed higher DNA fragmentation in gene-deficient embryos. Gene expression measurements, at day 4 of pregnancy showed significantly higher relative expression of *Adcyap1* (gene encoding PACAP) and *Hbegf* (gene encoding HB-EGF) in the uterine tissue of pregnant females with embryos. Furthermore, in the

case of PACAP, a significant relationship was found between uterine tissue expression and embryo development. With the elevation of *Adcyap1* expression by 0.001 gives 3.92-fold greater chance to a more advanced embryo. In the case of HB-EGF, we measured significantly higher expression in embryos with increasing development, but uterine tissue expression levels did not influence embryo development. We also found a correlation between expression levels in uterine tissue and embryos. The correlation coefficients show a weak positive relationship between both *Adcyap1* and *Hbegf* relative expression levels in the uterine tissue and also between uterine *Hbegf* and embryonic *Hbegf* relative expression levels. While the correlation coefficient between the uterine *Adcyap1* and embryonic *Hbegf* relative mRNA levels is not significantly different from zero.

Based on our studies in PACAP KO and wild-type males, we found no significant difference in either sperm motility or morphology.

When exogenous PACAP was applied to embryos during the *in vitro* culture, DNA fragmentation was significantly reduced in the 8  $\mu$ M PACAP-treated group compared to the control. Applying it during vitrification, the 2  $\mu$ M PACAP (EM2)-treated group showed a significantly higher rate of development at 24 hours post-thaw than the vitrified control, and higher *Hbegf* expression compared to fresh embryos.

The use of PACAP during cryopreservation of spermatozoa, showed no significant differences in motility between fresh spermatozoa and those treated with 4  $\mu$ M and 8  $\mu$ M PACAP, but a significant decrease was observed in the control and 2  $\mu$ M PACAP-treated groups. There were no significant differences between the groups in spermatozoa with normal morphology and acrosome defects.

Based on the above studies, we conclude that endogenous PACAP plays a cytoprotective role against DNA fragmentation during preimplantation embryo development, has a positive effect on preimplantation embryo quality and, in the absence of endogenous PACAP, increases the percentage of micronuclei, which reduces implantation ability. It may have a stimulating effect on the development of preimplantation embryos, as indicated by the fact that the increase in gene expression in the uterine tissue increases the chance of more advanced embryos. The positive effect on the development of preimplantation embryos has also been demonstrated by the use of exogenous PACAP in preimplantation embryo culture. The use of exogenous PACAP in preimplantation embryo culture improves embryo quality, reduces DNA fragmentation and increases post-cryopreservation survival in both embryos and spermatozoa in a dose-dependent manner.

### 3 Bevezetés

A humán asszisztált reprodukciós eljárások során rutin technikának számít a preimplantációs embriótenyésztés, az embriók és a spermiumok mélyhűtése, valamint az embrióbeültetés. Bizonyított tény, hogy a nők legfertilisebb időszaka 25-30 év között van. 35 év felett jelentős mértékben csökken a teherbeesés valószínűsége, miközben a vetélések esélye exponenciálisan nő (Dunson et al., 2002). A tapasztalatok szerint 43 éves kor után a teherbeesés valószínűsége már igen alacsony. Napjainkban mégis nő az a tendencia, miszerint a nők egyre később vállalnak gyermeket a 20-30 évvel ezelőtti időszakhoz képest, így az esetleges meddőségi problémákra is később derül fény, amikor már sokkal kevesebb jó minőségű ivarsejt, illetve embrió áll rendelkezésre az asszisztált reprodukciós eljárásokhoz, így ezek megőrzése, esetleges minőségbeli javítása létfontosságú az *in vitro* eljárások során. Új irányelvként jelent meg a klinikákon az úgynevezett „Single Embryo Transfer”, amely során csupán egy embrió kerül beültetésre, ezzel csökkentve az ikerterhességek előfordulási esélyét, ami mind az anyára, mind a magzatokra nézve komplikációkkal járhat. A ciklus során megtermékenyített egészséges többlet embriót a későbbi felhasználás érdekében pedig mélyhűtik. A krioprezerválás folyamata során a sejtek stressznek vannak kitéve, életképességük és minőségük csökken, az implantációs arány 16,6%-ra esik vissza (Valojerdi et al., 2009). Számos növekedési faktor és citokin játszik szerepet az embriók beágyazódásának és/vagy az endometrium receptivitásának szabályozásában, mégis a molekuláris mechanizmus emberben és állatokban egyaránt, a mai napig kevésbé ismert. A téma jelentőségénél fogva nagyon fontos lenne, hogy közelebbről megismerjük a folyamatot. Az eredmények és tapasztalatok hozzásegíthetnek bennünket ahhoz, hogy a humán reprodukciós klinikai gyakorlatban olyan új kezelési módszereket tudjunk alkalmazni, amelyekkel a beágyazódással kapcsolatos problémák miatt meddő párokat eredményesen lehet kezelni. A korai vetélések meglehetősen nagy százaléka (25-40%) (Wilcox et al., 1988) az implantáció alatt vagy közvetlenül utána következik be, mely arra enged következtetni, hogy a beágyazódás folyamata során történik hiba. Bár a humán asszisztált reprodukciós eljárások napjainkban már meglehetősen kifinomultak, az implantációs folyamatok kevésbé ismertek, ami komoly akadályozó faktor, így a sikertelen beágyazódás az egyik vezető korlátozó tényező az asszisztált reprodukciós eljárások során (Norwitz et al., 2001).

Mindezeket figyelembe véve kutatásunk során célul tűztük ki, hogy mélyebben megismerjük a hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) reprodukcióra gyakorolt hatását, valamint *in vitro* embrió tenyésztés és vitrifikáció során való alkalmazásának lehetőségeit és a bővülő ismeretek segítséget nyújtsanak az asszisztált reprodukciós eljárás különböző lépéseinek továbbfejlesztésében.

## 4 Irodalmi áttekintés

### 4.1 A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

#### 4.1.1 A PACAP felfedezése

Az adenohypophysis aktivitását a hypothalamus parvocelluláris területén termelt hypophyseotrop hormonok szabályozzák. A hypothalamus felszabadító hormonjai esetében megfigyelték, hogy stimulálják az agyalapi mirigy sejtjeiben az adenilát cikláz aktivitását és ezáltal növelik a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintet (Vale et al., 1981; Guillemin et al., 1982). Mind intracelluláris, mind extracelluláris cAMP növekedést figyeltek meg az *in vitro* tenyésztett hypophysis sejtekben, amely a növekedési hormon felszabadító hormon (GHRH) (Bilezikjian & Vale, 1983; Culler et al., 1984), és kisebb mértékben a kortikotropinfelszabadító hormon (CRH) (Labrie et al., 1982) esetében volt a legszembetűnőbb. A gonadotropinfelszabadító hormon (GnRH) (Borgeat et al., 1974) és a tireotropinfelszabadító hormon (TRH) (Bowers, 1971) szintén növeli a cAMP felhalmozódást, habár ezen hormonok esetében a cAMP nem feltétlenül játszik alapvető szerepet a gonadotropin és a tireotropin szekrécijában (Arimura, 1992).

Miyata és Arimura mindezeket figyelembe véve lehetségesnek tartották egy új hipotalamikus hormon felfedezését az agyalapi mirigy adenilát cikláz stimuláló aktivitásának (ACSA) megfigyelésével (Miyata et al., 1989). 4370 darab juh hypothalamus szövetet gyűjtöttek, melyeken elkezdtek vizsgálni, hogy a hypophysis adenilát cikláz aktiváló anyagok fizikokémiai szempontból különböznek-e a már ismert hypothalamus felszabadító hormonoktól. Az extrakció során, a domináns ACSA-t tartalmazó frakciókat liofilizálták, majd *in vitro* patkány hypophysis sejt kultúrán vizsgálták az ACSA szintjüket (Culler et al., 1984 alapján). 3 órás inkubálás után radioimmunoassay (RIA) technikával határozták meg a cAMP felhalmozódás mértékét a tenyésztő médiumban. Az eredmények alapján a GHRH-énál kisebb, ugyanakkor jelentősen nagy ACSA volt megfigyelhető a sejt kultúrában, ezért célul tűzték ki, az egyik ilyen anyag meghatározását. Egy jelentős ACSA-val rendelkező peptidet sikerült izolálniuk. Ezt a 38 aminosavból álló bázikus, amidált neuropeptidet, hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidnek, röviden PACAP-nak nevezték el (Miyata et al., 1989).

A PACAP szekvenciája tartalmaz egy belső hasító helyet, ami arra utal, hogy létezik egy 27 aminosav-szálas alfa-amidált polipeptid fragmentum is. Miyata és munkatársai 1 évvel később izolálták juh hypothalamus extraktum egyik mellék frakciójából a rövidebb, 27 aminosavból álló PACAP27-t, melynek N terminálisa megegyezik a PACAP38-cal, ugyanakkor sokkal kisebb mértékben van jelen a szövetben (Miyata et al., 1990). A PACAP27 szekvenciája 68%-os homológiát mutat a vazóaktív intesztinális polipeptiddel (VIP), amely azt mutatja, hogy

a PACAP a szekretin/glukagon/VIP peptid szupercsalád új tagja (Campbell & Scanes, 1992; Rosselin et al., 1982; Segre & Goldring, 1993; Vaudry et al., 2009).

#### 4.1.2 A PACAP előfordulása

A PACAP a legkonzervatívabb tagja a szekretin/glukagon/VIP peptid szupercsaládnak a nukleotidok és aminosavak hossza- és szekvenciaazonossága tekintetében. A felfedezése utáni első 10 évben 16 gerinces állatban azonosították, mint például ember (Miyata et al., 1990; Ohkubo et al., 1992), egér (Okazaki et al., 1995; Yamamoto et al., 1998), patkány (Ogi et al., 1990), juh (Miyata et al., 1989, 1990), tyúk (McRory et al., 1997), gyík (Pohl és Wank, 1998), béka (Chartrel et al., 1991), lazac fajok (Parker et al., 1993, 1997), harcsa (McRory et al., 1995) és rája (K. Matsuda et al., 1998).

PACAP		% azonosság
	10 20 30	
ember/juh/patkány/egér	HSDGIFTDSYSRYRQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK	100
tyúk	.I.....	97
béka	.....I..	97
lazac (5 faj)	.....R..YRS.	89
harcsa	.....R..R..FR..	89

1. ábra A PACAP aminosav szekvenciája a különböző gerincesekben. Az azonos aminosavakat pontok jelölik, míg az eltérőket az aminosavak egybetűs kódja mutatja. (Sherwood et al., 2000 alapján)

A PACAP biológiailag aktív régiójának szerkezete rendkívül konzervatív, 27 aminosavas szekvenciáján belül szinte teljesen megmaradt az evolúció során a halaktól az emlősökig (1. ábra), amelyek mintegy 380 millió évvel ezelőtt váltak el egymástól (Chartrel et al., 1991; Hoyle, 1998; Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2009). Mindez arra utal, hogy ez a peptid alapvető biológiai funkciókat tölthet be.

#### 4.1.3 A PACAP előfordulása a szervezetben

A PACAP felfedezését követően elkezdtek vizsgálni a peptid eloszlását emlősök (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993; Kivipelto et al., 1992; Köves et al., 1991; Vigh et al., 1991) és kétéltűek (Yon et al., 1992) agyában. Patkányokon végzett kísérlet során, a RIA mérések alapján a legnagyobb koncentrációban a hypothalamus régióban található (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993), továbbá megfigyelték, hogy a PACAP38 a domináns forma, a PACAP27 mindössze csak 10%-ban van jelen (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993; Hannibal et al., 1995; Masuo et al., 1993; Piggins et al., 1996). A PACAP-tartalmú neuronok, azonban nem korlátozódnak a hypothalamus területére, hanem széles körben megtalálhatóak

a különböző agyi régiókban (Gonzalez et al., 1998), mint például a cerebrális cortex, az amygdala, hippocampus, tobozmirigy, feketeállomány, híd, kisagy (Ghatei et al., 1993; Hannibal, 2002). Valamint a limbikus rendszerben szerepet játszik a szinapszisok kialakulásában (Kondo et al., 1997; Kozicz et al., 1997) és számos szimpatikus neuron neurotranszmissziójában is részt vesz (Brandenburg et al., 1997; Chibaa et al., 1996; S. Y. Wu & Dun, 1997; Sherwood et al., 2000).

A perifériás szervekben, akárcsak az agyban a PACAP38 a fő molekuláris forma, a PACAP27 csak kisebb részben van jelen, például herében alig kimutatható (Arimura et al., 1991). A PACAP széles körben kifejeződik a gyomor-bélrendszerben (Horvath et al., 2016; Reglodi, et al., 2018b; Rytel et al., 2021; Toth et al., 2020). Hat a különböző bélfolyamatokra, beleértve a motilitást (Fujimiya és Inui, 2000), a növekedési faktorok bélszekrúcióját (Al-Qudah et al., 2015) és az intersticiális Cajal-sejtek aktivitását (M. J. Wu et al., 2015). Számos kutatócsoport vizsgálta a dextrán- szulfát-nátrium (DSS) által kiváltott vastagbélgyulladás esetén a PACAP pozitív hatását. Azuma és munkatársai csökkent proinflammatorikus citokin szintet tapasztaltak a proximális és disztális vastagbélben PACAP KO egerekben (2008), míg Nemetz és munkatársai (2008) súlyosabb klinikai tüneteket figyeltek meg a KO egyedeknél. Továbbá a gasztrointesztinális traktus különböző szegmenseiben részt vesz a gyulladásos állapotok és a neuronális károsodást követő helyreállítási folyamatokban, valamint az intoxikáció és a neoplasztikus folyamatok szabályozásában is (Karpiesiuk és Palus, 2021).

A PACAP jelen van mind az exokrin hasnyálmirigyben, mind az endokrin Langerhans-szigetekben (Köves et al., 1993; Toth et al., 2020). Fridolf és munkatársai figyelték meg, hogy stimulálja a glükagonszekrúciót (Fridolf et al., 1992), ezen kívül serkenti az amidánszekrúciót (Kashimura et al., 1991), és az inzulinszekrúciót (Kawai et al., 1992). Yada és munkatársai kimutatták, hogy a PACAP az inzulinszekrúció rendkívül erős stimulátora és glükóz függő módon stimulálja az inzulin felszabadulását (Yada et al., 1994).

A PACAP és receptorai széles körű elterjedését írták le a vesében és az alsó húgyutakban, ahol szerepet játszik a vizeletürítésben, a vérellátásban, a hormontermelésben és a gyulladásos folyamatok szabályozásában (Heppner et al., 2019; Ojala et al., 2019). Számos tanulmány kimutatta a PACAP és receptorainak fontos szabályozó funkcióját a hólyag fiziológiájában az urotheliumban, az izomban és a hólyag innervációjában kifejtett hatásain keresztül (Reglodi et al., 2012a; Arms és Vizzard, 2011; Yoshiyama és de Groat, 2008a, 2008b). May és Vizzard (2010) PACAP génihiányos egerekben hólyagműködési zavarokat és megváltozott szomatikus érzékenységet tapasztaltak. Megnövekedett hólyagkapacitást, interkontrakciós intervallumot és detrusor kontrakciós időtartamot, valamint nagyobb mennyiségű vizelet reziduumot és csökkent szomatikus stimulációra való érzékenységet

figyelték meg. Humán tanulmányokból csak kevés áll rendelkezésünkre, ugyanakkor a PACAP csökkent expresszióját figyelték meg stressz által kiváltott húgyúti inkontinenciában szenvedő betegek hüvelyfalában, ami a peptid szerepére utal az inkontinencia patofiziológiájában (Hong et al., 2008). Mindezek mellett megfigyelték a PACAP szerepét a vizeletürítés idegi szabályozásában is. A gerincvelő átvágása megszakítja a vizeletürítési reflexpályát. A gerincvelő átvágása után jelentősen megnövekedett a PACAP immunreaktivitása a vizeletürítésben résztvevő gerincvelői szegmensekben és a dorzális gyökér ganglionokban (de Groat és Yoshimura, 2010; Vizzard, 2006; Zvarova et al., 2005).

A központi kardiorespiratorikus szabályozásban a PACAP szerepe még nem egyértelműen tisztázott. Megfigyelhető a szívben és az aortában (Vaudry et al., 2000; Dickson és Finlayson, 2009; Farnham és Pilowsky, 2010), csakúgy, mint receptora (Miyata et al., 1998; Wong et al., 1998). Továbbá receptora megtalálható az erekben, beleértve az artériákat, arteriolákat és kapillárisokat (Köves et al., 1990; Cardell et al., 1991; Huang et al., 1993; Fahrenkrug et al., 2000). Megfigyelhető a légutakban is, kezdve a légcső simaizomkötegein, erein át, egészen a bronchiolusokig (Cardell et al., 1991; Uddman et al., 1991; Hauser-Kronberger et al., 1996; Shigyo et al., 1998). Cummings és munkatársai kimutatták, hogy kritikus szerepet játszik az újszülöttkori légzés szabályozásában stressz esetén, melyet a légzési ritmus szabályozására vezettek vissza PACAP génkiütött újszülött egereken végzett kísérleteik során (Cummings et al., 2004, 2008; Arata et al., 2013).

#### **4.1.4 A PACAP élettani hatásai**

A PACAP szoros konzerváltsága arra utal, hogy funkciói a túléléshez nélkülözhetetlenek lehetnek. Fontos szerepet játszik a különböző neuronális és nem neuronális sejttípusok sejtosztódásának finomhangolásában (Sherwood et al., 2000). Szabályozza a sejtciklus leállítását, a differenciálódást és a sejthalált. Ezek az alapvető funkciók befolyásolhatják a fejlődést és a sejtciklust. Az *Adcyap1* (PACAP-ot kódoló gén) és az *Adcyap1r1* (PACAP 1. típusú receptort (PAC1) kódoló gén) egyidejű expressziója a petefészekben és a herékben arra utal, hogy a PACAP részt vehet a csírasedések érésében (Shivers et al., 1991; Sundler et al., 1992; Spengler et al., 1993; Kononen et al., 1994; M. Li et al., 1998).

A PACAP részt vesz a sejtek apoptózissal szembeni védelmében és az apoptózis kiváltásában is (Cavallaro et al., 1996; Campard et al., 1997; Gonzalez et al., 1997; Spengler et al., 1997; Gillardon et al., 1998; Vaudry et al., 1998). Az apoptózis vagy másnéven programozott sejthalál egy szigorúan ellenőrzött, a sejt által indított önmegsemmisítő program. Két fő funkciója a fejlődés szabályozása és a károsodott sejtek elpusztítása. A PACAP komplex jelátviteli utakon keresztül gyakorolja antiapoptotikus hatását. A legtöbb esetben a PAC1



receptor a kulcsfontosságú elem a citoprotekcióban. A PACAP a PAC1 receptorok révén aktiválja az adenilát-cikláz és foszfolipáz C enzimeket, amelyek cAMP-függő és független útvonalakat indítanak el. A protein-kináz A (PKA) aktiváció révén megnő a protektív hatású mitogén aktivált protein-kináz (MAPK) aktivitása. Ez foszforilálja az extracelluláris szignál szabályozott kinázt (ERK), mely a sejtbe jutva aktiválja a sejtvédő faktorokat. A PKA aktiváció emellett gátolja a sejthalálhoz vezető Jun N-terminális-kináz (JNK) és a p38 mitogén aktivált protein-kináz (p38MAPK) foszforilációját. A PACAP befolyásolja az apoptózis mitokondriális folyamatát is, egyrészt növeli a Bcl (B-sejtes limfóma) fehérjecsaldó antiapoptotikus tagjainak (Bcl-2, Bcl-xL) aktivitását, másrészt gátolja a proapoptotikus tagokat (Bad, Bax). A PACAP erősen csökkenti a kaszpáz enzimek működését, de akadályozza a kaszpázoktól független apoptotikus eseményeket is (Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004; Várnagy, 2012).

#### **4.1.5 A PACAP élettani jelentősége a reproduktív szervekben**

##### **4.1.5.1 Nőivarú reproduktív szervrendszer**

Az elmúlt 30 évben, a PACAP kutatása során megfigyelték, hogy több szinten is befolyásolja a termékenységet és a reprodukciót. Primer hypophysis sejtültúrában megfigyelték, hogy szabályozza a gonadotropinok termelődését, mind közvetlen, mind közvetett módon (Winters és Moore, 2020). Közvetlen módon hatással van a gonadotropin szekrécióra, közvetett módon pedig GnRH hatásának modulálásával (Culler és Paschall, 1991; Hart et al., 1992). Közvetlenül serkenti a luteinizáló hormon (LH) felszabadulását, bár a hatása kisebb, mint a GnRH-é és gyorsabban deszenzibilizálódik (Tsuji és Winters, 1995). Jelentősebben, közvetett hatása érvényesül, fokozza a GnRH-val stimulált hypophysis sejtek LH és follikuluszstimuláló hormon (FSH) szekrécióját (Culler és Paschall, 1991; Tsujii et al., 1994; Ortmann et al., 1999). A peptid és receptorai széles körben és stádium specifikusan fordulnak elő a gonádokban és jelenlétüket számos más reproduktív szervben is kimutatták (Brubel et al., 2010; Reglődi et al., 2012b; Reglődi et al., 2018a).

A korai folliculogenesis gonadotropin független módon történik, de a későbbi tüszőnövekedést, az ovulációt és a luteinizációt elsősorban az agyalapi mirigy által termelt gonadotropinok, az FSH és az LH szabályozzák. Hatásuk azonban számos más peptiderg és nem-peptiderg jelátviteli utaktól is függ (Mayerhofer et al., 1997; Bódis et al., 2001; F. Matsuda et al., 2012). Lee és munkatársai patkány petefészken való vizsgálataik során a PACAP-ot a folliculus túlélő faktoraként írták le, mivel dózis függő módon elnyomja az apoptózist a tüszősejtekben. Megfigyelték, hogy a gonadotropinok a PACAP mRNS indukcióját okozzák a preovulatorikus folliculusok granulóza sejteiben, amely elnyomja a tüsző sejteinek apoptózisát és serkenti a preovulatorikus tüszők progeszterontermelését (Lee et al., 1999), ezzel serkentve a luteinizációt (Gräs et al., 1999). A PACAP mRNS gonadotropin-függő szabályozását

később szarvasmarha preovulációs tüszőkben is igazolták (Sayasith et al., 2007), valamint humán granulosa sejtekben is megfigyelték, hogy az FSH és az LH fokozza a PACAP expresszióját (Morelli et al., 2008). Patkány petefészek több sejtjében is megfigyelték a PACAP jelenlétét (Gräs et al., 1996; Scaldaferrri et al., 1996). Gräs és munkatársai PACAP-ot tartalmazó sejteket találtak a preovulációs és az ovulációs időszakban a granulóza sejtekben, a theca sejtekben, a stroma sejtekben és a cumulus sejtekben is, továbbá a petefészeket innerváló idegrostok is immunpozitivitást mutattak. Mindezek arra utalnak, hogy a PACAP számos, hormonálisan, valamint neuronálisan szabályozott folyamatokban részt vesz a tüszőfejlődés során (Gräs et al., 1996). Park és munkatársai éretlen, illetve preovulációs tüszők granulózasejtjein figyelték meg, hogy a GnRH stádiumfüggő módon szabályozza a PACAP génexpressziót. Míg az éretlen tüszők granulózasejtjeiben a GnRH gátló hatással volt a PACAP mRNS szintjére, addig a preovulatorikus tüszők granulózasejtjeiben serkentőleg hatott. A PACAP expressziója tehát differenciáltan szabályozott a ciklus során (Park et al., 2001) és fontos szerepet játszik a preantrális folliculusok növekedésének és differenciációjának szabályzásában (Cecconi et al., 2004).

Az emlős szervezetben, a granulosa sejtek által termelt gátló faktorok hatására, a petesejt az első meiotikus osztódás profázisában megakad. A gátlás alól csak a preovulatorikus LH-csúcs hatására szabadul fel. Az oocyta érésének gátlását és annak feloldását tehát gonadotropin és számos más faktor együttes hatása szabályozza. Apa és munkatársai megfigyelték, hogy a PACAP gyorsította a meiotikus érést a tüszőben és a cumulussal körülvevő oocytákban, míg gátolta a denudált petesejtekben. Ez a megfigyelés a PACAP stádiumfüggő szabályozására utal a petesejt érési folyamatában (Apa et al., 1997). Hiperstimulációs kezelésben résztvevő betegek tüszőfolyadékának PACAP szintje és a kinyert petesejtek száma között korrelációt találtak, amely felhívja a figyelmet arra, hogy a PACAP a fejlődő petesejt közegének fontos eleme és a jövőben biomarkerként való használatára is lehetőség nyílhat termékenységi problémákkal küzdő nők esetében (Koppan et al., 2012).

Megfigyelték, hogy a PACAP szerepet játszik a hüvelyfal, valamint a méh és a méhszáj izmainak összehúzódsában (Steenstrup et al., 1995; Ziessen et al., 2002) továbbá pre- és posztmenopauzában lévő nőknél csökkent immunreaktivitást mutatott a hüvelyfalban (Hong et al., 2008).

#### **4.1.5.2 Termékenység**

Az endogén PACAP hiánya jelentős hatással van a termékenységre és a reprodukcióra. PACAP génhányos (KO) egereken végzett vizsgálatokban alacsonyabb reprodukciós rátát tapasztaltak (Shintani et al., 2002; Sherwood et al., 2007; Isaac & Sherwood, 2008). Isaac és Sherwood csupán 21%-os ellési arányt tapasztaltak a PACAP KO nőstényeknél a párzást követően, szemben a vad típusú egerekkel, ahol ez az arány 100%-os volt. Nem találtak különbséget az ovulációban, a petefészek szövettanában vagy a párzást igazoló szemínális dugó meglétében, ugyanakkor jelentős rendellenességet találtak az implantációban és a kapcsolódó hormonszintekben és az utódok mortalitási arányában (Isaac és Sherwood, 2008). Spencer és munkatársai összefüggésbe hozták a PACAP-ot az implantációhoz szükséges decidua kialakulásával és a progeszteronszinttel. A PACAP hatással van a preovulatorikus granulózasejtek progeszteront szekretáló lutein sejtekké történő átalakítására (Gräs et al., 1999; Lee et al., 1999), a progeszteron pedig létfontosságú a méh endometriumának szerkezeti és funkcionális átalakulásához, a decidualizációhoz (Fülöp et al., 2022), így feltételezhető, hogy ennek a folyamatnak a hibája okozza a PACAP génhányos egerekben megfigyelt alacsonyabb implantációs rátát. Megfigyeléseik szerint továbbá az endometriális PACAP mRNS fiziológiailag összefügg a progeszteronreceptorok és a deciduális prolaktin kifejeződésével a decidua fejlődése során (Spencer et al., 2001). Isaac és Sherwood kísérletében a szérumszint több, mint háromszor alacsonyabb volt a PACAP KO nőstényekben a vad típusú egerekhez képest. A sárgatestből történő progeszteronszekréció a korai vemhességben az agyalapi mirigy prolaktin szekréciójától függ. A PACAP KO egerekben szignifikánsan alacsonyabb szérumszintet tapasztaltak az implantáció utáni időszakban (E6,5), mint a vad típusú egyedekben. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a méh csökkent implantációs fogékonyságának egyik fő oka valószínűleg a prolaktin alacsonyabb szekréciója az elülső agyalapi mirigyből, ami a petefészek lutein sejtjeinek alacsonyabb progeszteron-termelését eredményezi (Isaac és Sherwood, 2008). Eredményeik azt mutatják, hogy a PACAP fontos szerepet játszik a vemhesség létrejöttében és az implantációban.

#### **4.1.5.3 Terhesség, vemhesség**

A PACAP-ot kimutatták placentában is, ahol mind a peptid, mind receptorai jelen vannak (Scaldeferri et al., 2000; Spencer et al., 2001; Koh et al., 2005; Brubel et al., 2010). Itt befolyásolja a méh-placentáris egység véráramlását (Steenstrup et al., 1996) és befolyásolja a trophoblast sejtek túlélését is (Boronkai et al., 2009). A PACAP szérumszintje egészséges terhes nőknél a terhesség harmadik trimeszterében emelkedik, majd a szülés során jelentősen csökken, végül a szülést követő 3. napon eléri a szülés előtti szintet (Reglödi et al., 2010). A PACAP magas koncentrációját kimutatták az emberi és állati tejben (Borzsei et al., 2009;

Csanaky et al., 2012), ami arra utal, hogy a peptid az újszülött számára fontos szereppel bír, azonban pontos funkcióját még nem azonosították.

#### **4.1.5.4 Hím ivarú reprodukív szervrendszer**

A PACAP a hypothalamus-hypophysis működésén túl közvetlen hatással van a gonádokra. A PACAP nagy koncentrációban van jelen a herékben (Arimura et al., 1991; Hannibal & Fahrenkrug, 1995), és a spermaticidák már korai stádiumában, ami arra utal, hogy szerepet játszik a spermiogenezisben (Arimura & Shioda, 1995; Nakamura et al., 2014; Reglodi et al., 2018a). A spermiogenezis egy kritikus pontján az érő spermaticidákban stádiumspecifikus módon expresszálódik (Shioda et al., 1994; Kononen et al., 1994; M. Li et al., 1998). Továbbá befolyásolja a mellékhere epithelium  $\text{Cl}^-$  szekréciónak, mely feltehetően hozzájárul a stabil mikrokörnyezet fenntartásához, ami elengedhetetlen a spermiumok érésének és raktározásának elősegítéséhez (Zhou et al., 1997). Brubel és munkatársai megfigyelték, hogy a PACAP kezelés szignifikánsan növelte a gyors, illetve lassú progresszív spermiumok arányát a humán mintákban, míg csökkentette a nem-progresszív és immotilis spermiumok arányát. További vizsgálataik során kisebb spermiumfej átmérőt tapasztaltak a PACAP génihiányos hím egereknél, anélkül, hogy a fej alakja jelentősen különbözött volna a vad típusú egyedekétől (Brubel et al., 2012). A PACAP-nak számos más hatását is megfigyelték. Stádiumspecifikus szupresszív hatással van az éretlen Leydig-sejtek proliferációjára, és dózis-függő módon stimulálja a tesztoszteron szekréciónak a Leydig-sejtekben (Rossato et al., 1997; El-Gehani et al., 1998, 2000; Matsumoto et al., 2008). Rossato és munkatársai PACAP-pal kezelt, felnőtt, patkány Leydig-sejteken figyelték meg, hogy a plazmamembrán  $\text{Na}^+$  függő depolarizációján keresztül indukálja a tesztoszteron termelést (Rossato et al., 1997).

Számos tanulmányban kimutatták a PACAP-ot a spermiumok fejlődő akroszómájában, ugyanakkor funkcionális szerepe tisztázatlan maradt, mivel az érett és epididymalis spermiumokban nem találtak immunreaktivitást (Hannibal & Fahrenkrug, 1995; Leung et al., 1998; Shioda et al., 1994; Yanaihara et al., 1998). Tanii és munkatársai azonban egy PACAP ellen előállított antiszérummal sikeresen kimutatták epididymalis spermiumok akroszómájában is. Mivel az akroszóma olyan molekulákat tartalmaz, amely szükséges a spermiumok oocytához való eljutásához, eredményük felveti az akroszómális PACAP fertilizációban betöltött szerepét (Tanii et al., 2011). A fertilizáció során a spermiumok a petesejtet körülvevő két fő extracelluláris rétegbe penetrálnak, először a cumulus rétegbe, majd a zona pellucidába. A cumulus sejtek szelektív gátként működnek a spermiumoknak a petesejt felé történő mozgásban, ezáltal a morfológiailag vagy funkcionálisan abnormális spermiumok számára megakadályozza az oocytához való kapcsolódást. Számos tanulmány számol be arról, hogy

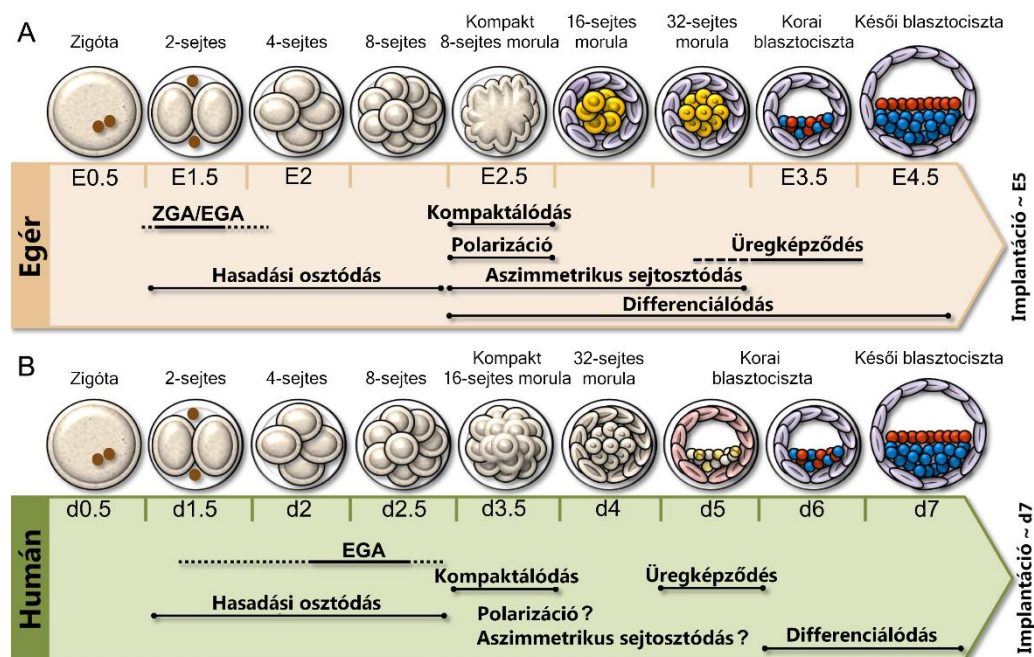
a cumulus sejtek a spermiumok működését befolyásoló oldható faktorokat közvetítenek, mint például prosztaglandinok és progeszteron, melyek serkentették a spermiumok előrehaladását (Bradley & Garbers, 1983; Westphal et al., 1993; Fetterolf et al., 1994), hiperaktív mozgást és akroszóma reakciót is indukáltak (Roldan et al., 1994; Jaiswal et al., 1999). Azonban a szekréció szabályozásának mechanizmusai, és az, hogy az oldott faktorok hogyan segítik elő a megtermékenyülést, még kevésbé ismertek. Tanii és munkatársai PACAP-specifikus receptort (PAC1R) figyeltek meg a cumulus sejtek külső rétegében. Lokalizációja arra utal, hogy a spermiumok és a cumulus sejtek közötti PACAP által közvetített kölcsönhatás ezen a helyen történik, valószínűsíti azt a felvetést, hogy a fertilizáció során a cumulus rétegen való áthaladás során játszik szerepet (Tanii et al., 2011). PACAP-pal inkubált cumulus-oocyta komplexen végzett *in vitro* egér kísérleteik során, szignifikánsan nagyobb fertilizációs arányt tapasztaltak dózis-függő módon, a kontrollcsoport arányához képest. Továbbá megfigyelték a spermiumok PACAP-pal kezelt oldatban való inkubálása során, hogy indukálta a hiperaktív mozgást és serkentette a zona által kiváltott akroszóma reakciót is, ami növeli a spermiumok zona pellucidán való áthaladását és így a sikeres termékenyítést. A PACAP kezelés során megnövekedett progeszteron mennyiséget mutattak ki. Mivel humán, egér, sertés és nyúl cumulus sejtek esetében is megfigyelték, hogy progeszteront szintetizálnak és szekretálnak (Osman et al., 1989; Vanderhyden & Tonary, 1995; Chian et al., 1999; Yamashita et al., 2003; Guidobaldi et al., 2008) illetve humán spermiumok sejtfelszíni receptort expresszálnak a progeszteron számára (Luconi et al., 2004) és a progeszteron koncentrációja kemotaktikusan/kemotaxis útján vonzza a humán és egér spermiumokat (Teves et al., 2006, 2009), feltételezhető, hogy a PACAP ezen folyamaton keresztül játszik szerepet a fertilizációban. Tanii és munkatársai arra utalnak, hogy a PACAP a cumulus rétegen való áthaladás során szabadul fel az akroszómából, és a PAC1R révén hat a cumulus sejtekre, vélhetően arra serkentve a sejteket, hogy oldható faktorokat, például progeszteront szekretáljanak, így segítve a spermiumokat megtermékenyítés befejezésében (Tanii et al., 2011).

## **4.2 Asszisztált reprodukciós eljárások során használt vizsgálati módszerek**

### **4.2.1 Preimplantációs embriók minőségbírálata**

A preimplantációs időszak egereknél átlagosan 4,5 napig, míg embereknél nagyjából 1 hétig tart (Niakan et al., 2012). Ebben az időszakban az embrió sejtes, molekuláris és epigenetikai változások sorozatán esik át (Albert és Peters, 2009; Fujimori, 2010). A fertilizációt követően a zigóta egymást követő hasadási osztódásokon megy keresztül. Az egér esetében az első osztódás 16-20 órával, míg embernél 30 órával a fertilizáció után történik meg. Az

osztódások kezdeti szakaszában a blastomerek morfológiailag azonos tulajdonságokkal bírnak (Duranthon et al., 2008). A morfológiai differenciálódás először a kompaktálódás során figyelhető meg, amikor a blastomerek egymáshoz szorosabban tapadnak és polarizálódnak (Johnson és Ziomek, 1981; Johnson et al., 1986; Eckert és Fleming, 2008). Ez a folyamat a 8 sejtes egérembrióban sejtes aszimmetriát hoz létre, amelynek eredményeként a negyedik (8-16 sejtes átmenet) és ötödik (16-32 sejtes átmenet) osztódásakor két differenciálódó sejtosztódásra kerül sor. Az embrió külső részén elhelyezkedő blastomerek a trophoctoderma réteget, míg a belül elhelyezkedő blastomerek az embriócsomót alakítják ki (ICM) (Marikawa és Alarcón, 2009). Amikor az egérembrió eléri a 32 sejtes stádiumot, a trophoctodermális sejtek elkezdik a környezeti folyadék transzcelluláris úton történő pumpálását, hogy kitöltsék a formálódó blasztociszta blastocoel üregét. Bár a humán embriók az egérembriókhoz képest később esnek át ezeken a fejlődési szakaszokon, a kialakult sejtvonalak megegyeznek (2. ábra) (Sozen et al., 2014). Hardy és munkatársai (1989) azt találták, hogy a blasztocisztákban a trophoctoderma és az embriócsomó sejteinek száma hasonló az egér embriókban megfigyelhető számokhoz. Az egér, a korai embrionális fejlődés legjobban tanulmányozott állatmodellje (Sozen et al., 2014).

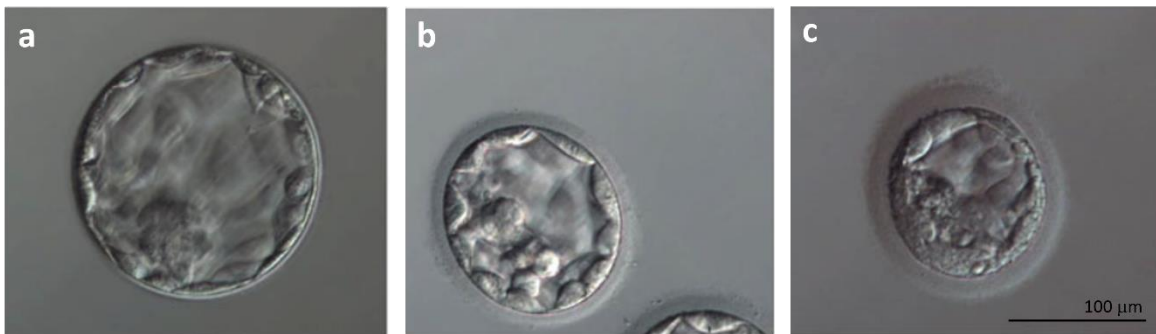


2. ábra A preimplantációs fejlődés időbeli eltérése egér (A) és humán embriók (B) esetében ZGA/EGA- zigotikus/embrionális genom aktiváció (Sozen et al., 2014).

Az asszisztált reprodukciós eljárások során, a világszerte végzett embrió-beültetések számának növekedésével az embrió morfológiáján alapuló osztályozási rendszerek alakultak ki. Az egyik első, a blasztociszták morfológiai jellemzőin alapuló osztályozási rendszert Dokras és munkatársai publikálták, ahol a morfológiai jellemzőket korrelálták a klinikai kimenetelre

vonatkozó adatokkal (Dokras et al., 1993; Balaban et al., 2000, 2006). Bírálatak elsősorban a fejlődési sebességet és a blastocoel kialakulásának (üregképződés) és kiterjedésének mértékét, valamint az ICM jellemzőit veszi figyelembe (3. ábra):

- Grade I. – legjobb minőségű embrió: korai üregképződés jellemzi, ami egy excentrikus majd expandáló blastocoel kialakulását eredményezi, ICM és trophoctoderma jól elkülönül
- Grade II. – egy vagy több, éles, homorú határral rendelkező vakuólum látható az embrióban, néhány embrió esetében azonban 24-48 óra elteltével az ICM és a trophoctoderma elkülönül, ebben a szakaszban morfológiailag már nem különbözik a Grade I blasztocisztától
- Grade III. – az ICM-ben több a degeneratív góc, a sejtek sötétek, nekrotikusak, a blastocoel általában 24 órán belül összeesik, anélkül, hogy jelentősen tágult volna (Dokras et al., 1993; Balaban és Gardner, 2013)



3. ábra Dokras osztályozási módszerén alapuló embrió bírálat. a) Grade I. b) Grade II. c) Grade III. (Dokras et al., 1993; Balaban és Gardner, 2013)

#### 4.2.2 Implantáció folyamata, beágyazódásra ható növekedési faktorok előfordulása és szerepük a szervezetben

Emlősökben a megtermékenyített petesejtből származó zigóta, majd embrió számos sejtosztódáson és differenciálódáson megy keresztül, mire eléri a blasztociszta fejlődési állapotot, ami a zona pellucidából (ZP) történő kibújás után már képes kommunikálni, majd fizikai kapcsolatot kialakítani a méh endometriumával (epithelium) (Red-Horse et al., 2004). Az implantáció folyamata a méh üregében szabadon mozgó blasztociszta endometriummal való kommunikációjával kezdődik, melynek feltétele az embrió és a méh szinkronizált fejlődése. Először a méhbe érkező embrió jelzést küld az anyának, hogy megakadályozza a vemhesség fennmaradásához nélkülözhetetlen progeszteron szint lecsökkenését, valamint a prosztoglandinok termelődésének beindítását (Duc-Goiran et al., 1999). A luteolízis

megakadályozása elengedhetetlen feltétele az implantációval kapcsolatos folyamatok beindulásának, vemhesség fennmaradásának.

Az implantáció három szakaszra bontható: az apozícióra, a kapcsolódásra és a penetrációra. Apozíció során a blasztociszta embrió instabilan tapad az endometriumhoz, amelyet lokális parakrin jelátvitel szabályoz. A kapcsolódás során már kialakul a stabil tapadás, mely egerek esetében a párzás utáni 4. nap estéjén következik be. A folyamat egybeesik az érpermeabilitás lokális növekedésével a blasztociszta kötődés helyén. Az utolsó fázisban, a penetráció során az embrió áthatol a lamina epithelium és a basalis lamina rétegen, miközben vaszkuláris kapcsolatot is kialakít (Makrigiannakis és Minas, 2007). Ez lehetővé teszi az embrió további tápanyaghoz jutását, védelmét és fejlődését, azaz a vemhesség, terhesség létrejöttét.

A beágyazódás a legkritikusabb lépés a vemhesség kialakulása során. A zavartalan beágyazódás feltételei: a receptív endometrium, az egészséges blasztociszta stádiumú embrió és a feto-maternális párbeszéd szinkronja. Mindezek összehangolását citokinek és növekedési faktorok szabályozzák (Dey et al., 2004). Ennek molekuláris mechanizmusa még nem tisztázott. A feto-maternális párbeszéd a fejlődő embrió és az endometrium komplex kölcsönhatása, amely magában foglalja a maternális immuntolerancia fejlődését és a celluláris és humorális immunválasz megváltozását (Kayisli et al., 2004; Strowitzki et al., 2006). Ezeket a sejtes és molekuláris módosításokat endokrin hormonok és helyi parakrin faktorok szabályozzák (Duc-Goiran et al., 1999). Parakrin faktorokat termel az endometrium hámja, a decidualizált stromasejtek, valamint az immunsejtek (Simón et al., 1998), melyek lokálisan kiválasztódnak a méh lumenébe és ott befolyásolják a blasztociszták fejlődését és beágyazódását, valamint hatással vannak a különböző sejtfunkciókra és az extracelluláris mátrix kialakulására (Lessey et al., 2002). Ezek közé a parakrin faktorok közé tartoznak a növekedési faktorok, a citokinek és a kemokinek (Whitman és Melton, 1989; Dey et al., 2004). A növekedési faktorok egy olyan jelátvivő fehérjecsaldó, amelynek tagjai stimulálják a sejtnövekedést, a proliferációt (Li és Zhuang, 1997) és a differenciálódást (Red-Horse et al., 2004). Jelentős mértékben termelődnek a preimplantációs periódusban, melynek ténye azt sugallja, hogy fontos szerepet tölthetnek be az implantációs folyamatokban (Tazuke és Giudice, 1996).

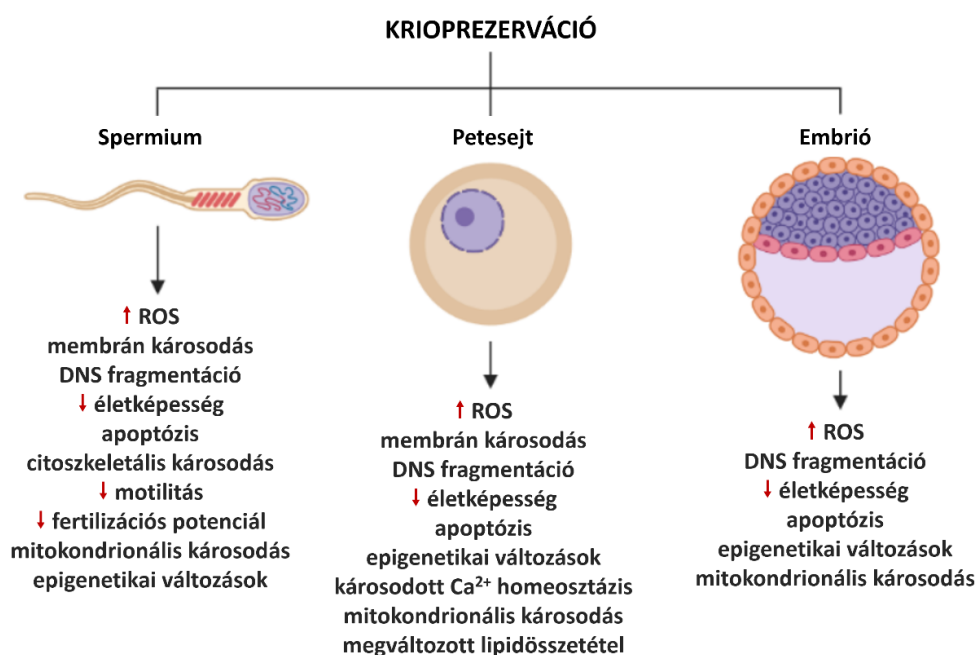
A heparin binding epidermal growth factor - like growth factor (HB-EGF) endometriális sztróma sejtekben és epitheliális sejtekben szekretálódik és kimutatták, hogy szerepet játszik a deciduális transzformációban, az endometriális sejtek proliferációjának (Li és Zhuang, 1997), az epitheliális szekréciójának szabályozásában (Simón et al., 2000). Az ovulációt követő 5-8. napon éri el expressziójának csúcsát a méh epitheliális sejtjeiben (Bischof és Campana,



2000), amelyből arra lehet következtetni, hogy ez a növekedési faktor fontos szerepet tölthet be a blasztociszta implantációjának szabályozásában, mivel mind egér, mind humán vonatkozásban, ez idő alatt zajlik az embriók beágyazódásának folyamata. Megtalálható oldódó és transzmembrán formában is, melyeket az endometriális receptivitás legelső markereként mutattak ki nőstény egerek méhében, kifejezetten az aktív blasztociszták környékén, a kötődési reakció előtt (Lim et al., 1998). Oldható formája növeli a blasztociszta kibújási esélyét, míg transzmembrán formája a receptorkapcsolatot hozza létre (Guzeloglu-Kayisli et al., 2009). Hiánya preimplantációs embrió elhalást okoz, vemhesség során fellépő hiánya esetében pedig gyakori a növekedési retardáció vagy a vetélés (Tsutsumi és Oka, 1987; Kamei et al., 1993; Threadgill et al., 1995).

### 4.2.3 Krioprezerváció és hatása a sejtekre

Az ivarsejtek és embriók kriokonzerválása egyre nagyobb figyelmet kapott az elmúlt évtizedekben. A biológiai anyagok  $-196^{\circ}\text{C}$ -ra való lehűtése gátol minden biológiai tevékenységet, beleértve a sejthalálban szerepet játszó biokémiai reakciókat is (Vladimirov et al., 2018). A nulla fok alatti hőmérséklet nem fiziológiás állapot a sejtek számára (Estudillo et al., 2021). A krioprezerválás folyamata során a sejtek stressznek vannak kitéve, köszönhetően az alacsony hőmérsékletnek és a jégkristály képződés által kiváltott fizikai változásoknak, amelyek károsítják a sejtek szerkezetét és működését (4. ábra) beleértve a folyadékfázisban lévő oldott anyagok koncentrációjának megváltozását (Vladimirov et al., 2018).



4. ábra A krioprezerváció hatása az ivarsejtekre és az embriókra. A krioprezerváció anyagcserével, epigenetikai változással, DNS integritással, sejthalállal és a citoszerkezettel kapcsolatos molekuláris károsodásokat okoz. ROS-reaktív oxigéngyök (Estudillo et al., 2021 alapján)

Számos krioprezervációs protokollban a jégkristályképződés megakadályozására vagy csökkentésére krioprotektáns anyagokat (CPA) használnak (Fowler & Toner, 2006). A krioprotekció alapja az intracelluláris fagyás elkerülése vagy minimalizálása, valamint a koncentrált oldott anyagok fagyásából származó károsodások csökkentése (McGann, 1978). A CPA-k csökkentik az oldat fagyáspontját, miközben védik a sejtmembránt a fagyasztás során. Szerkezetüket tekintve kis molekulatömegű oldott anyagok, amelyek nagy vízdoldhatósággal és vízzel gyengén kölcsönható poláros csoportokkal rendelkeznek (Fahy et al., 2004). Membrán permeabilitásuk alapján két csoportra oszthatók. Az extracelluláris CPA-k, mint a cukrok és a polietilén-glikol, stabilizálják a sejtmembránt (Crowe et al., 1983) és ozmotikus grádiens hatására kivonják a vizet a sejtekből (Vladimirov et al., 2018), helyükre pedig intracelluláris CPA-k áramlanak, melyek közé tartozik a glicerin, az etilén-glikol (EG), a propilén-glikol és a dimetil-szulfoxid (DMSO).

Humán területen a termékenység megőrzése, értékes állatok esetében a specifikus genotípusok elterjedésének fokozása, illetve a biodiverzitás megőrzése érdekében a veszélyeztetett fajok, fajták fennmaradása céljából számos technikát dolgoztak ki (Luvoni & Colombo, 2020). Ezek közül a lassú fagyasztás és a vitrifikáció a két legelterjedtebb módszer.

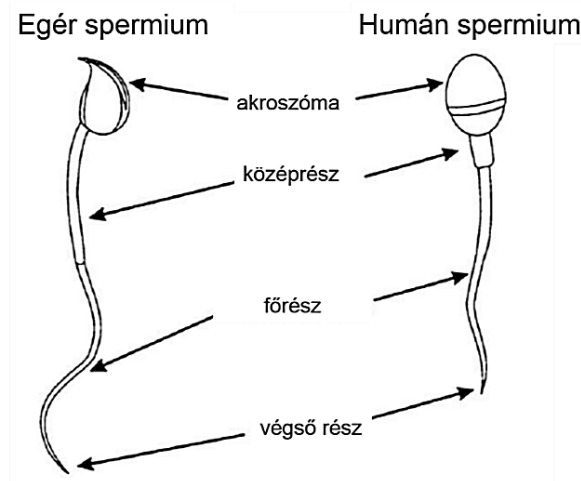
A lassú fagyasztás, másnéven programozott mélyhűtés, alacsony CPA koncentráción és lassú hűtési sebességen alapszik. Kisebb toxicitással jár a sejtek, szövetek számára, ugyanakkor jelentős mértékű a jégkristályképződés. A minták erre kifejlesztett tároló eszközökben (pl: krioprezerváló szalma), programozható fagyasztó gépbe kerülnek, majd a hőmérsékletüket lassú sebességgel (0,3-2°C/perc) csökkentik protokolltól függően egészen -30°C – -80°C-ig, ekkor folyékony nitrogénbe helyezve tartósan tárolhatóak a minták (Vladimirov et al., 2018). A folyamat hosszú, általában 2-3 órát vesz igénybe, és költséges szabályozott sebességű fagyasztógépre van szükség, ugyanakkor megbízhatóbb, sikeressége kevésbé függ a használó gyakorlottságán.

A vitrifikáció, a lassú fagyasztás mellett az embriók és ivarsejtek konzerválásának alternatív módszere. Mechanizmusának alapja a nagy koncentrációjú CPA-k használata, és a gyors fagyasztási sebesség optimális egyensúlyának megtalálása. Ennek köszönhetően, mind az intra-, mind az extracelluláris jégkristályok kialakulása elkerülhető, ugyanakkor a CPA-k toxicitása károsíthatja a sejteket a vitrifikáció során. Ennek csökkentése érdekében elterjedt a különböző CPA-k keverékének használata az elterjedt (Vladimirov et al., 2018). A folyamat során a sejtek csak igen rövid ideig inkubálódnak a CPA-kkal, majd közvetlenül folyékony nitrogénbe helyezik a mintákat, ezzel elérve a rendkívül gyors, >500°C/perc hűtési sebességet. Nem igényel drága berendezéseket, és folyamata is rövidebb időt vesz igénybe, ugyanakkor komoly gyakorlatot igényel a pontos kivitelezése. A vitrifikációs technikánál

jelentek meg az úgynevezett nyitott rendszerek (pl: „open pulled straw” OPS), a lassú fagyasztásnál használt zárt, például szalma használata mellett. A nyitott hordozók esetében a sejtek közvetlenül érintkeznek a folyékony nitrogénnel, ami nagyobb hűtési sebességet tesz lehetővé, ugyanakkor magában rejti a kontamináció kockázatát a tárolás során. Ezzel szemben a zárt rendszer használatával csökken a fertőzés kockázata, azonban a hűtési sebesség lassul (Vladimirov et al., 2018).

#### 4.2.4 A spermium felépítése, gyakoribb morfológiai rendellenességek

A spermiumok morfológiájának megfelelő értékelése számos nehézségbe ütközhet az objektivitás hiányában. Ennek elkerülésére a WHO (World Health Organization) által elfogadott normális/abnormális humán spermium morfológiai osztályozást szükséges használni. A spermiumok fejre (caput), nyakra (collum) és farokra (cauda) tagolódnak. Mivel a humán és egér spermiumok felépítése hasonló (Darszon et al., 2006), ezért vizsgálatunkhoz is ezt az objektív osztályozási formát választottuk (5. ábra).



5. ábra Egér és humán spermium morfológiai összehasonlítása (Darszon et al., 2006)

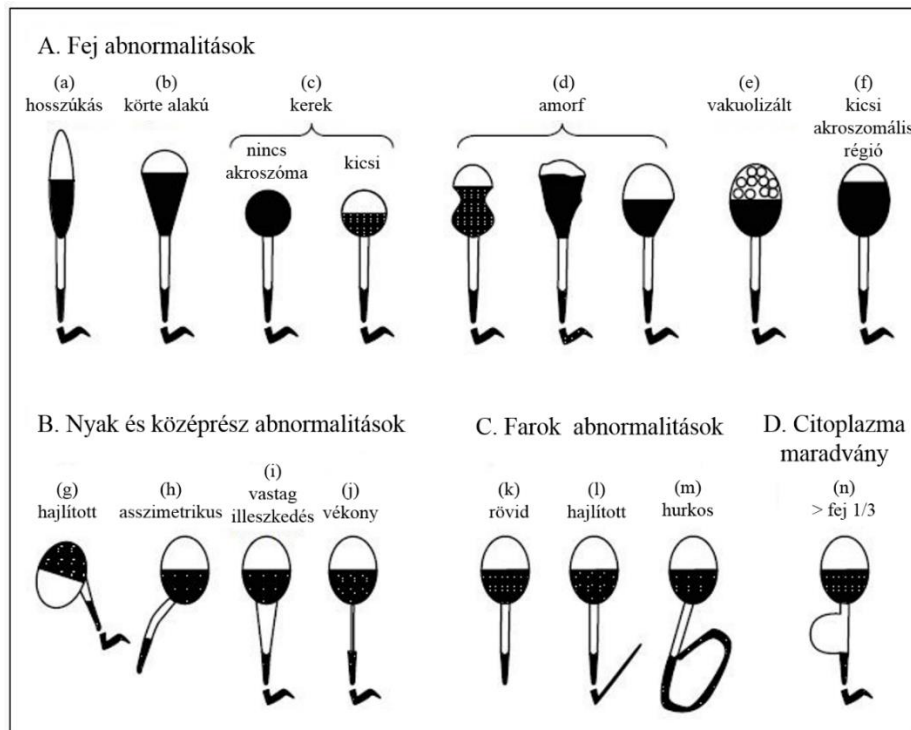
A normál morfológia feltétele, hogy mind a fejnek, mind a faroknak normálisnak kell lennie. Minden határértéken túli elváltozást abnormálisnak kell tekinteni. (World Health Organization, 2010). Normális morfológiai jellegnek minősülnek az alábbiak:

- A fej sima, kontúros, egér esetében kampó alakú. Tartalmaz egy jól körülhatárolható akroszomális régiót, mely a fej 40-70%-át tölti ki (Menkveld et al., 2001). Az akroszomális régió nem tartalmazhat nagy, vagy kettőnél több kisebb vakuólumot, melyek nem lehetnek nagyobbak a fej 20%-nál.

- A fark középrészre (pars media), főrésze (pars principalis) és végső részre (pars terminalis) tagolódik. A középrész karcsú, szabályos és hossza nagyjából megegyezik a spermium fejével. Hosszanti tengelye megegyezik a fej hosszanti tengelyével. A főrész egész hosszában ugyanolyan átmérőjű, vékonyabb, mint a középrész, és nagyjából tízszer hosszabb a fejnél.

Az alábbi morfológiai jegyek abnormitásra utalnak (6. ábra):

- Fej túl nagy vagy túl kicsi, körte alakú, kerek vagy amorf. Az akroszomális régió kisebb, mint a fej 40%-a vagy nagyobb, mint a fej 70%-a, nagy vagy kettőnél több vakuólumot tartalmaz. Előfordulhat kettős fejűség és ezek kombinációi.
- Nyak és középrész aszimmetrikusan illeszkedik a fejhez. Középrész vastag vagy szabálytalan, élesen hajlított, abnormálisan vékony, illetve ezek kombinációi. Tartalmazhat citoplazma maradványt, mely a spermiogenezis hibás működéséből adódik. Normál működés esetén a középrészt csak keskeny citoplazma veszi körül (Fehér, 1987) Abnormálisnak minősül, ha a fej egyharmadánál nagyobb területű.
- Főrész rövid, törött, éles szögben ívelt, szabálytalan szélességű vagy visszakunkorodott.



6. ábra Morfológiai abnormitások (World Health Organization, 2010)

## 5 Célkitűzések

A PACAP szoros konzerváltsága és szervezetben való széleskörű elterjedése miatt, szeretnénk volna megvizsgálni szerepét a reprodukció különböző szintjein, valamint antiapoptotikus hatását kihasználva megvizsgálni, hogy a külsőleg adagolt PACAP előnyösen befolyásolja-e az asszisztált reprodukciós eljárások sikerességét.

Fentiek alapján az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg (1. táblázat):

### Endogén PACAP hatásának vizsgálata

1. a nőstények ciklusára (1. kísérlet)
2. a preimplantációs embriók fejlődésére és az implantáció esélyére (2. - 3. kísérlet)
3. a spermiumok motilitására és morfológiájára (4. kísérlet)

A fenti irodalmi adatok alapján azt feltételezzük, hogy a külsőleg adagolt PACAP előnyösen befolyásolhatja bizonyos asszisztált reprodukciós eljárások sikerességét, ezért kutatásunk második felében erre irányuló vizsgálatokat tűztünk ki célul.

### Exogén PACAP hatásának vizsgálata

1. az *in vitro* embriótenyésztés során (5. kísérlet)
2. sejtvédő anyagként embriók vitrifikálása során (6. - 7. kísérlet)
3. spermiumok mélyhűtése során (8. kísérlet)

1. táblázat A kísérletek célját és elrendezését az alábbi táblázat foglalja össze

<b>Kísérlet száma</b>	<b>Célja</b>	<b>Kísérleti állatok</b>	<b>Mért paraméterek</b>
<b>1. kísérlet</b>	<i>endogén PACAP hatása a nőstények ciklusára</i>	CD1 PACAP KO vs. vad típusú nőstények	<i>bélsár ösztadiol és progeszteron (RIA)</i>
<b>2. kísérlet</b>	<i>endogén PACAP hatása a preimplantációs embriók fejlődésére</i>	CD1 PACAP KO vs. vad típusú embriók	<i>mikronukleusz arány (SYBR14 fluoreszcens festés)</i>
<b>3. kísérlet</b>	<i>endogén PACAP hatása a preimplantációs embriók fejlődésére és az implantáció esélyére</i>	a) BDF1 vemhes vs. álvemhes b) c) BDF1 vemhes nőstények és embriók	<i>Adcyap1 és Hbegf expressziós szint (qPCR)</i> a) <i>méhszöveti expresszió embrió jelenlététől függően</i> b) <i>embriófejlődés</i> c) <i>korreláció</i>
<b>4. kísérlet</b>	<i>endogén PACAP hatása a spermiumok motilitására és morfológiájára</i>	CD1 PACAP KO vs. vad típusú hímek	<i>motilitás (CASA) és morfológia (Spermac festés)</i>
<b>5. kísérlet</b>	<i>exogén PACAP hatása az in vitro embriótenyésztés során</i>	BDF1 embriók	<i>mikronukleusz arány (SYBR14 fluoreszcens festés)</i>
<b>6. kísérlet</b>	<i>exogén PACAP hatása a vitrifikáció utáni túlélésre</i>	BDF1 embriók	<i>továbbfejlődési arány</i>
<b>7. kísérlet</b>	<i>exogén PACAP hatása a vitrifikáció utáni implantációs esélyre</i>	BDF1 embriók	<i>Hbegf expressziós szint (qPCR)</i>
<b>8. kísérlet</b>	<i>exogén PACAP hatása spermiumok mélyhűtése során</i>	<i>menhelyi kutyák ivartalanításából származó mellékhere</i>	<i>motilitás (CASA) és morfológia (Spermac festés)</i>

## **6 Kísérleti állatok tartási körülményei**

A PACAP konzerváltsága és humán és egér PACAP38 szekvenciájának 100%-os azonossága, valamint preimplantációs embriófejlődésben mutatott fejlődési szakaszok és a kialakul sejtvonalak azonossága miatt, vizsgálataink többségéhez az egeret választottuk modellállatnak. A vizsgálatokat BDF1 egértörzs 10-12 hetes egyedein, valamint CD1 egértörzs 10-12 hetes vad típusú (PACAP-pal rendelkező, kontroll) és PACAP KO egyedein végeztük. Utóbbiakat a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai tanszéke biztosította számunkra. Az állatokat a budapesti Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti Tanszék és Haszonállatgyógyászati Klinika kísérleti állatházában tartottuk 21°C-os hőmérsékleten, 65%-os páratartalom és 12 óra sötét /12 óra világos fényprogram használata mellett. Kísérleteink során az egereken cervikális diszlokáció alkalmaztunk. Az állatok tartási körülményei megfelelnek az aktuális jogszabály feltételeinek (PE/EA/1101-7/2017; PE/EA/1062-6/2021).

Az exogén PACAP spermiumok mélyhűtése során való alkalmazhatóságának vizsgálatát a nagyobb volumen és a kevésbé invazív beavatkozás, valamint a veszélyeztetett fajták génmegőrzésének indokoltsága miatt kutyák mellékheréjéből nyert spermiumokon végeztük, melyhez a szükséges mintákat a Szülészeti Klinika menhelyi kutyák ivartalanítását célzó programjából kaptuk.

## 7 Endogén PACAP hatásának vizsgálata a nőstények reprodukciójára

### 7.1 PACAP hatása a ciklusra

#### 7.1.1 Anyag és módszer

##### 7.1.1.1 Ciklusdiagnostika - hormonvizsgálat

Az ösztadiol és progeszteron napi szintjeinek méréséhez CD1-es egértörzs egyedek bésármintáit használtuk fel. Ezzel a non invazív mintavétellel elkerülhető az egereket ért stressz, és a vérvétel okozta fájdalom, ugyanakkor jól mérhető a szteroidhormon-metabolit szint (Schwarzenberger, 2007). Az 5 PACAP KO és az 5 vad típusú nőstény egeret egyedileg, külön-külön ketreccben helyeztük el, majd minden nap a délelőtti órákban (10-11:00 között) gyűjtöttük a mintákat, összesen 21 napon keresztül. Ezzel az időtartammal a nőstények 5 napos ciklusa miatt, átlagosan 4 ciklust tudtunk lefedni. Minden mintavételt alomcsere követett, így elkerültük előző napi minták esetleges begyűjtését. (PE/EA/1101-7/2017).

A hormonvizsgálathoz bésár extraktumot használtunk. Az extrahálás Isobe és munkatársai (2005) módosított protokollja alapján történt:

100 mg bésárhoz 100 µl desztillált vizet és 800 ml 80%-os metanolt adtunk, majd 30 percen keresztül vortexeltük. Az ezt követő centrifugálás 2500 rpm-es fordulatszámon, 20 percig zajlott 4°C-on. Ezután 30 perc -50°C-os hűtés következett. Az idő leteltével a metanolos fázisból 100 µl-t kivettünk, majd 2 órán át szárítottuk (Binder VD53, Binder; Németország). Végül a szárított extraktumot 100 µl PBS-ben rehidráltuk, és ezt használtuk a méréshez.

A progeszteron radioimmunoassay-hez Csernus és munkatársai (1982) metodikáját vettük alapul, amely során H<sup>3</sup>-mal jelölt progeszteront használtunk (PerkinElmer; USA). Az intra-assay CV<10% az inter-assay CV Kontroll1 esetén 9,16%, Kontroll2 esetén 7,34% volt (gyártó által biztosított alacsony és magas kontroll). Analitikai érzékenység 0,7365 nmol/l.

Az ösztadiol meghatározását bevont csöves RIA KIT-tel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően (Dia Source immunoassay AS RIA CT teszt KIP0629; Belgium). Az intra-assay CV<10% az inter-assay CV Kontroll1 esetén 11,38%, Kontroll2 esetén 13,45% volt. Alacsony és magas kontrollként a laborban rendszeresen használt, korábban begyűjtött mintákat használtuk. Analitikai érzékenység 0,25 pg/ml (0,9178 pmol/l).



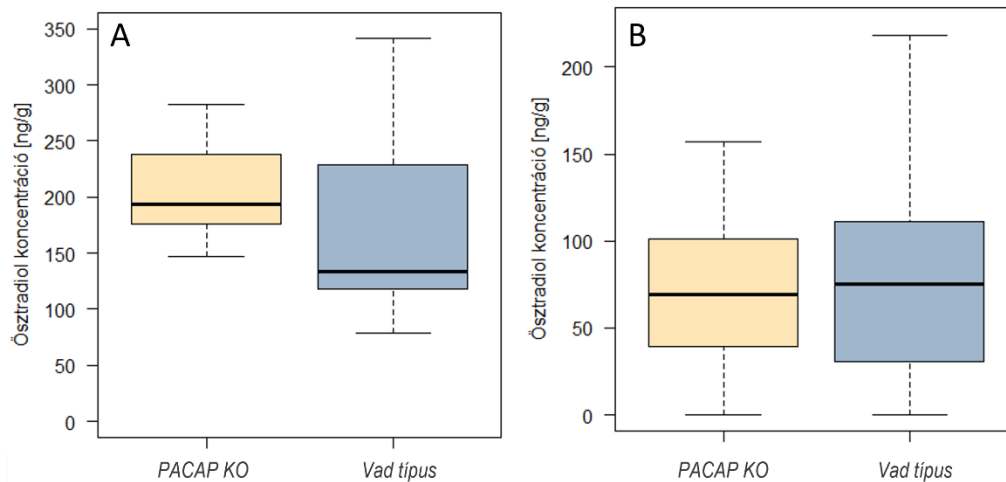
A progeszteronszinteket nmol/l-ben, az ösztradiol szinteket pedig pg/ml-ben kaptuk meg, majd a szakirodalomban is elterjedt módon, a bélsár metabolitok eredményeit korigáltuk (figyelembe véve a hormonok moláris tömegét) és ng/g szilárd anyagban adtuk meg.

#### **7.1.1.2 Statisztikai analízis**

A ciklusdiagnosztika elemzésénél figyelembe kellett venni, hogy az egyes egerektől, illetve az egerek különböző ciklusaiból származó hormonszint adatok egymástól nem függetlenek. A két kezelési csoportban az ösztradiol alap- és csúcsszint, illetve a progeszteron plató és mélypont átlagok összehasonlítására általános lineáris kevert modelleket (LME) használtunk. Ezzel a módszerrel az ismételt mérések közötti korreláció figyelembe vehető, így a torzított becslések elkerülhetőek (Pinheiro & Bates, 2000). Az ösztradiol csúcspont és a progeszteron mélypont összehasonlítások esetében a random hatás az egyes egerek azonosítója volt, míg az ösztradiol alapszint és progeszteron plató esetében az egerek azonosítója, illetve az egyedi ciklusok száma volt. A modellek alkalmazhatóságának feltételeit (reziduum szóráshomogenitás, reziduumok és random hatások normalitása) diagnosztikai ábrák segítségével ellenőriztük. Az elemzéshez szükséges volt az R statisztikai programhoz letölthető NLME könyvtár (Pinheiro et al., 2014) használata.

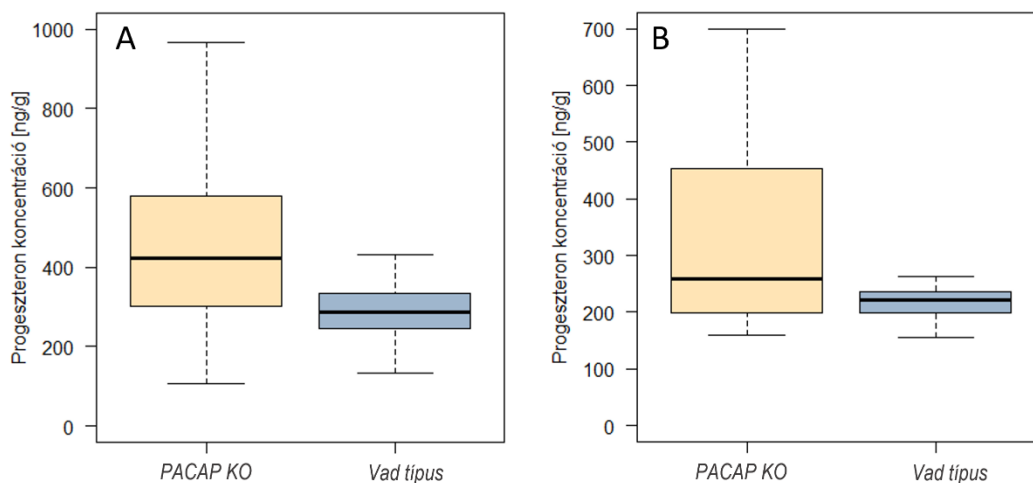
### 7.1.2 Eredmények

A PACAP KO egereknél három nőtény esetén 3, kettő esetén 4 ciklust tudunk elkülöníteni az ösztradiol csúcs alapján. A vad típusú nőtényeknél pedig négy egyednél 4, egy egyednél 3 ciklus különítettünk el. Az ovulációt megelőző ösztradiol csúcsok értékeiben ( $p=0,47$ ), valamint alapszintjének értékeiben ( $p=0,5$ ) nem volt szignifikáns különbség a két kezelési csoportban (7A és 7B ábra).



7. ábra Ösztradiol koncentrációk csúcs (A) – és alapértékei (B) az egyes csoportokban

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a két kezelési csoport progeszteron platósztintjeiben ( $p=0,1$ ) és mélypont értékeiben ( $p=0,07$ ) sem volt szignifikáns különbség (8A és 8B ábra).



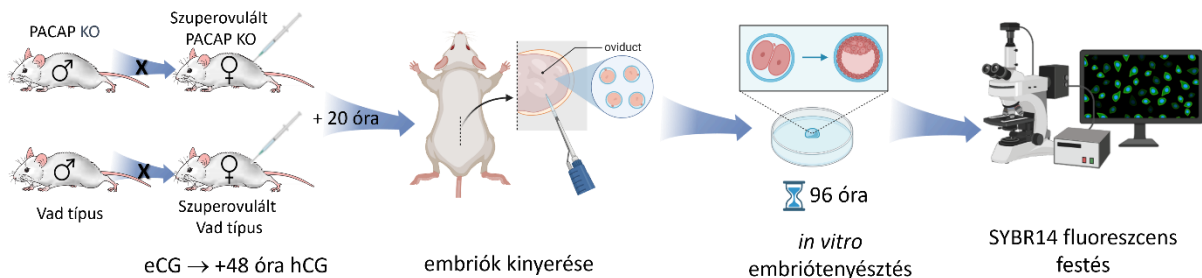
8. ábra Progeszteron plató (A) – és mélypontértékek (B) az egyes csoportokban

## 7.2 PACAP hatása a preimplantációs embriók fejlődésére

### 7.2.1 Anyag és módszer

#### 7.2.1.1 Embriók kinyerése és *in vitro* tenyésztése

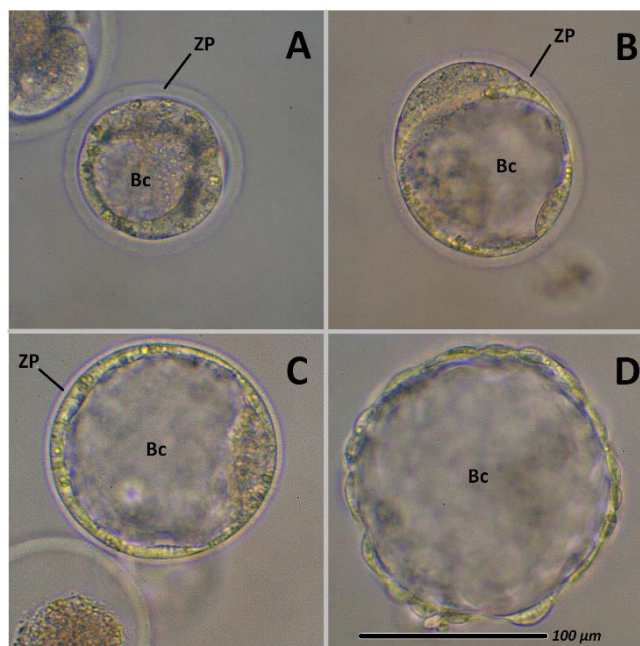
Vizsgálataink során CD1 egértörzs 7-7 vad típusú és PACAP KO nőtényét használtunk (PE/EA/1101-7/2017). A nőtény egereket szuperovuláltattuk, ennek során intraperitoneálisan 7,5 NE eCG injekcióval, 48 óra elteltével pedig 7,5 NE hCG-vel (mindkettő Alvetra und Werfft AG; Ausztria) kezeltük őket. Előbbi a tüszőérést serkenti, utóbbi pedig kiváltja az ovulációt. A hCG injekciót követően egy éjszakára PACAP KO nőtényt PACAP KO hímhez, vad típusú nőtényt vad típusú hímhez helyeztünk. A zigótákat a párást követő reggelen nyertük ki a petevezeték ampulláris részéből. Az embriók kinyeréséhez speciális tápfolyadékot használtunk (PBS + 20% FBS [Sigma-Aldrich; Kanada]). Az embriókat több rétegben körülvevő cumulus sejteket hialuronidáz (Sigma-Aldrich; Kanada) enzim segítségével távolítottuk el. A megtisztított embriókat G-1™ PLUS (Vitrolife; Svédország) tápfolyadékban 96 órán keresztül *in vitro* tenyésztettük (37,5 °C, 6,5% CO<sub>2</sub>, maximális páratartalom) (PACAP KO esetben n=90, vad típus esetében n=82) (9. ábra).



9. ábra PACAP KO és vad típusú embriók *in vitro* tenyésztése és vizsgálata

#### 7.2.1.2 Embriók fejlettségének és minőségének vizsgálata

A 96 óra inkubálást követően sztereomikroszkóp segítségével kiválogattuk a blasztociszta stádiumú embriókat. A blasztociszták morfológiájára jellemző a megjelenő nagyméretű blastocoel, a vékony zona pellucida és a kialakuló embriócsomó (10. ábra (Somoskői et al., 2016)). További vizsgálatainkhoz csak a normál morfológiájú, Grade I. minőségű blasztocisztákat használtuk (PACAP KO esetén n=64, vad típus esetén n=57).



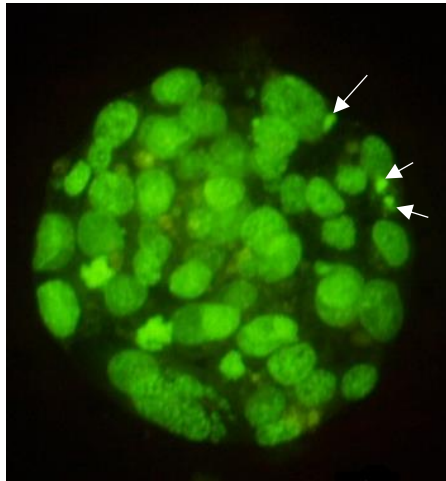
10. ábra Blastociszták morfológiai változása fejlettségi állapotuknak megfelelően  
 A= korai blastociszta; B= középidős blastociszta; C= expandált blastociszta; D= kibújt  
 blastociszta, Bc=blastocoel; ZP= zona pellucida; nagyítás: 400x

A gyenge minőségű blastocisztákat, és a korábbi fejlődési stádiumban lévő embriókat (pl.: morula, 8 sejtes) kihagytuk a vizsgálatokból.

Meghatároztuk a kiválogatott Grad I. blastociszták sejtszámát. A sejtszám meghatározására SYBR14 festéket használtunk, ami a SYBR Green egy módosított változata. Az élő sejtet jelölő SYBR14 festék egy DNS kettőslánchoz kötődő fluorescens festék, amelynek fluoreszcenciája a DNS-hez kötötten 2000-szer magasabb, mint szabadon. 400 µl G-1 tápfolyadékban lévő embriókhoz 2,5 µl SYBR14 festéket injektáltunk, majd 15 percre inkubátorba helyeztük. Az idő leteltével 2,5 µl propidium-jodidot (PI) adtunk hozzá. Az élő sejtek membránja impermeabilis a PI számára, ugyanakkor az elhalt sejtek membránintegritása megszűnik, így a PI képes a DNS-hez kötődni, és gerjesztve piros színt bocsát ki. Ismételt 15 perces inkubálás után tárgylemezen lévő 4%-os paraformaldehid (PFA) cseppben fixáltuk az embriókat. A SYBR14 festési technika alkalmas arra is, hogy a normál morfológiájú sejtmagokon kívül a töredezett kromatinállománnyal (mikronukleusz) rendelkező blastomerek arányát is megállapítsuk (11. ábra). A mikronukleusz a kromoszómatörés és a mitotikus orsó diszfunkciójának bizonyítéka, és gyakran képződik különböző stresszfaktorok hatására is (pl.: fagyasztási stressz) (AbdelHafez et al., 2011; Heddle et al., 1991). Jackson és munkatársai (1998) összefüggésbe hozták a magas mikronukleusz arányt a gyenge beágyazódási sikerrel. Továbbá kapcsolatot találtak a fejlődés folyamatának akadályozásával

(Moriwaki et al., 2004), a sejtciklus S fázisának zavarával (Ye et al., 2003) és az apoptózissal (Hnida et al., 2004) is.

Az eredményt fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus BX40) állapítottuk meg, és a kiértékelés céljára fényképet (Olympus E-330 digitális kamera) készítettünk. A képeket imageJ szoftverrel (imageJ 1.50i) elemeztük. A sejt- és mikronukleuszszám megállapítására a Cell Counter plugint használtuk.



11. ábra SYBR14 festéssel megfestett embrió, nyilak a mikronukleuszt mutatják

Az adatokat R statisztikai programmal (R Development Core Team, 2016) elemeztük. A két kezelési csoportban a sejtszám és a mikronukleusz arány összehasonlítására kétmintás t-próbát használtunk.

## 7.2.2 Eredmények

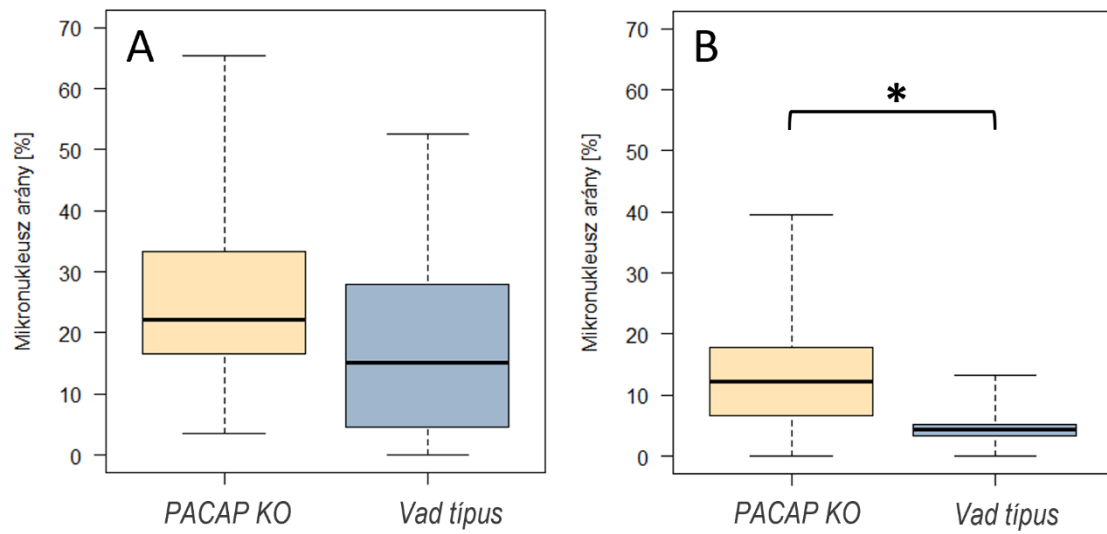
### 7.2.2.1 Embriófejlődés

Az embriók vitalitására és fejlettségére következtethetünk a blasztomerek számából. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a PACAP KO embriók nagyobb átlagos sejtszámmal rendelkeztek, mint a vad típusúak ( $p=0,0022$ ; KO:  $58,17 \pm 14,9$ ; vad típusú:  $40,40 \pm 7,4$ ).

### 7.2.2.2 Embrióminőség

A mikronukleusz arányokat tekintve, azoknál a blasztocisztáknál, amelyek a 96 órás tenyésztés alatt csak a korai stádiumot érték el, nem volt szignifikáns különbség a két csoport között ( $p=0,18$ ) (12A ábra) és szignifikánsan magasabb arányban ( $p=0,02$ ) tartalmaztak mikronukleuszt, mint a fejlettebb blasztociszták (középidős, expandált, kibújt).

A fejlettebb embriók esetében viszont szignifikánsan nagyobb arányban tartalmaztak mikronukleuszt a PACAP KO embriók ( $p=0,01$ ) (**12B** ábra).



12. ábra Korai (A) és Fejlettebb (B) blasztooszták mikronukleusz arányai a két csoportban

## 7.3 PACAP hatása az implantáció esélyére

### 7.3.1 Anyag és módszer

Vizsgálatunkhoz BDF1 egértörzset használtunk (PE/EA/1101-7/2017).

#### 7.3.1.1 Vazektomizált hím és álvemhes nőtények előállítása

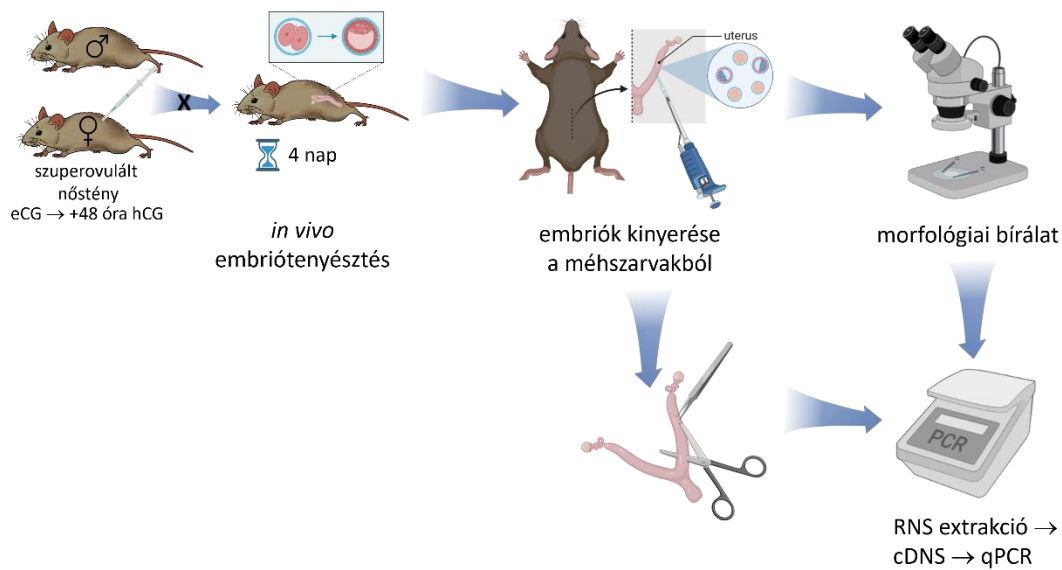
Kísérletünk egyik részeként szeretnénk volna megvizsgálni, hogy függ-e az embriók jelenlététől az *Adcyap1* (PACAP-ot kódoló gén), valamint az implantációt szabályozó *Hbegf* (HB-EGF-et kódoló gén) méhszöveti expressziója. Ennek vizsgálatához vazektomizált hímekkel való pároztatást követően, álvemhes nőtényeket vontunk be a kísérletbe.

A vazektomizációt az első párzás előtt 10-14 nappal végeztük, hogy a hímek a sebészi beavatkozásból felépüljenek. A műtétet intraperitoneális avertin anesztetikummal, megfelelő fertőtlenítéssel végeztük. A hím egyedeket a hátára fektettük, majd mérsékelt nyomást gyakoroltunk a hasára, hogy a heréket a scrotumba nyomjuk. A herezacskón középvonaltól balra 1 cm-es bemetszést ejtettük, majd a *ductus deferens*-t kihúztuk és a végek kiégetésével 0,5 cm-es szakaszt távolítottunk el belőle (Ittner & Götz, 2007). Az eljárást megismételtük a jobb oldali here esetében is, majd a bemetszéseket Surgibond szövetragasztóval (SMI, Belgium) zártuk (13. ábra).



13. ábra Hím egerek vazektomizálása a *ductus deferens* 0,5 cm-es szakaszának kivágásával

### 7.3.1.2 Embriók *in vivo* tenyésztése, kinyerése és méhszövet darabok begyűjtése



14. ábra Implantációs esélyre gyakorolt hatás vizsgálatának folyamatábrája

Vizsgálataink során a nőstény egereket (n=24) szuperovuláltattuk (7,5 NE eCG; 7,5 NE hCG). A hCG injekciót követően a nőstény egerek egyik felét (n=12) egy éjszakára vazektomizált hímekhez helyeztük, így embrióval nem rendelkező, álvemhes nőstényeket hoztunk létre, másik felét pedig fertilis hímekhez helyeztük (1 hím / 1 nőstény). Az embriókat *in vivo* tenyésztettük és a párzást követő 4. nap reggel nyertük ki a méhszarvakból (14. ábra, 15. ábra). Az embriókat a kinyeréskor speciális tápfolyadékba helyeztük (PBS + 10% FBS [Sigma-Aldrich; Kanada]).



15. ábra Méhszarvak eltávolítása az embriók kinyeréséhez és a méhszövet darab begyűjtéséhez a párzást követő 4. napon



Morfológiai vizsgálat alapján, sztereomikroszkóp (Olympus SZX7) segítségével meghatároztuk az embriók fejlettségi állapotát. Ez alapján három csoportba soroltuk őket (fejletlen, morula és blasztociszta) (16. ábra). A fejletlen embriókra jellemző a néhány osztódás után megrekedő pár sejtes állapot, és a vastag zona pellucida. Morula fejlődési állapotba soroltuk azokat az embriókat, akik a 4 napos *in vivo* fejlődést követően egy kompakt, blasztomerekre nem elkülönülő, tömör állapotot értek el. Ennél fejlettebb állapot, a blasztociszta, amelyben elkezd kialakulni és folyamatosan növekedni a blasztocoel, valamint fokozatosan kezd elvékonyodni a zona pellucida és kialakul az embriócsomó (ICM). A megnövekedett belső nyomás, és a vékony zona pellucida lehetővé teszi az embrió kibújását, mely az implantáció létrejöttéhez létfontosságú.



16. ábra Morfológia alapján elkülönített fejlődési állapotok: A= fejletlen; B= morula; C= blasztociszta; ZP= zona pellucida; Bm= blasztomer; Bc= blasztocoel; ICM= embriócsomó

A méhszövet minták begyűjtéséhez mind a vemhes, mind az álvemhes nőstények méhszarvából 5 mm-es darabokat vágunk ki (17. ábra) a párzást követő 4. napon. Az embriókat és a méhszövet mintákat egyedi azonosítóval ellátva, 100µl PBS oldatba [Sigma-Aldrich; Kanada] helyeztük.



17. ábra Vizsgálatainkhoz 0,5 cm hosszú darabot vágunk ki a méhszarvak középső részéből

### **7.3.1.3 Molekuláris biológiai vizsgálatok**

#### **RNS kivonás**

Az RNS kivonáshoz Direct-zol™ RNA MiniPrep oszlopos kivonó kit-et használtunk (Zymo Research; USA). A mintákhoz 100 µl TRI Reagenst adtunk, a méhszövet darabokat mechanikailag roncsoltuk és 12 000 g x 1 perces centrifugálás után leszívtuk a felúszót. Ezután 200 µl 96%-os etanolt adtunk mind a felúszóhoz, mind az embriókhoz. A keveréket oszlopokba helyeztük, majd 30 másodpercig centrifugáltuk. DNase kezeléshez 400 µl RNA Wash Buffert adtunk az oszlophoz. Centrifugálás után RNase mentes csőben összekevertünk 5 µl DNase I-et és 75 µl DNA Digestion Buffert. A keveréket az oszlophoz adtuk, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően 400 µl RNA PreWash oldatot adtunk hozzá. Ezt a lépést centrifugálás után megismételtük. Majd 700 µl Wash Buffer oldatot adtunk az oszlophoz és 2 percig centrifugáltuk, ügyelve arra, hogy a teljes folyadékmennyiség kiürüljön. Ezután RNase mentes csőbe helyeztük az oszlopot, és 50 µl DNase/RNase-free water-rel kimostuk az RNS-t az oszlopból.

#### **cDNS átírás**

A cDNS átíráshoz RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et használtunk (Thermo Scientific, USA). A reagenseket jégen kevertük:

- 10 µl templát RNS
- 1 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> primer
- 1 µl nuclease-mentes víz
- 4 µl 5X Reaction Buffer
- 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ µL)
- 2 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl Revert Aid M-MuLV RT (200 U/ µL)

Ezt követően 60 percig 42°C-os, majd 5 percig 70°C-os inkubálás következett.

#### **Kvantitatív real-time PCR**

A polimeráz láncreakció során, a reagenseket szintén jégen kevertük:

- 10 µl Master mix (FastStart Essential DNA Green Master, Roche Diagnostics, Svájc)
- 8 µl cDNS
- 1-1 µl forward és reverse primer (Bio Basic Canada Inc., Kanada) (2. táblázat)

2. táblázat *Gapdh*, *Adcyap1* és *Hbegf* forward és reverse primerek szekvenciái

Gén	Forward	Reverse	
<i>Gapdh</i>	GCTACACTGAGGACCAGGTTGT	CTCCTGTTATTATGGGGGCTG	(Xu et al., 2016)
<i>Adcyap1</i>	CCGAAAACAAATGGCTGTCAAG	CTGTGCATTCTCTAGTGCTTCA	(Xu et al., 2016)
<i>Hbegf</i>	CTGAAGGTTCCCTATAGCTCAGGTCCT	GAGAGACCCATGCCTCAGGAAATAC	Designed with SnapGene software (GSL Biotech LLC)

A szekvenáláshoz LightCycler® Nano (Roche Diagnostics, Svájc) PCR berendezést használtunk. A *Hbegf* szekvenálás során a PCR kezdeti lépéseként elődenaturáltuk a cDNS-t 95°C-on 2 percig. Ezt követte a 95°C-on 30 másodpercig végzett denaturáció, az 59°C-on 30 másodpercig végzett anellálás, majd a 72°C-on végzett elongáció szintén 30 másodpercig, 45 cikluson keresztül. A *Gapdh* housekeeping referencia gén elemzését a *Hbegf*-fel megegyező protokollal végeztük. Az *Adcyap1* szekvenálása esetén az anellálás 49,6°C-on történt, a többi érték megegyezett. A PCR lépéseinek megírásához LightCycler® Nano Software 1.0.7-t használtunk (Roche Diagnostics, 2012).

Eredményeink kiértékeléséhez a kapott Ct (Threshold Cycle) értékeket normalizáltuk. Ehhez az alábbi képletet használtuk:  $2^{\Delta Ct}$ , ahol  $\Delta Ct = Ct_{\text{housekeeping gén}} - Ct_{\text{vizsgált gén}}$ . Így megkaptuk a vizsgált gének relatív expresszióját/mRNS szintjét.

### Gélelektroforézis

Az amplifikált termékeket 1%-os agaróz gélen futtatva ellenőriztük. Az eljárás során az agaróz gélhez 5 µl ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution 20,000×-t (Pacidic Image Electronics, USA). Az 5 µl-es termékhez 1 µl 6X MassRuler™ DNA Loading Dye-t (Thermo Scientific, USA) keverünk, majd ezeket az agaróz gél zsebeibe töltöttük. A termékek hosszának meghatározásához FastRuler™ Low Range DNA Ladder-t (Thermo Scientific, USA) használtunk. A termékeket 100 volt-on, 25 percig futtattuk (Clever Scientific Ltd. nanoPAC-300).

#### 7.3.1.4 Statisztikai analízis

Az adatokat R statisztikai programmal (R Development Core Team Version 1.0.153, 2017) elemeztük. A vemhes, illetve álvemhes nőtények szöveti *Adcyap1*, illetve *Hbegf* relatív expressziójának összehasonlítására kétmintás t-próbát használtunk.

Az embriók fejlődésére gyakorolt méhszöveti PACAP és HB-EGF hatásának elemzésénél figyelembe kellett venni, hogy az egyes egerektől származó minták egymástól nem függetlenek. Az embriókhoz tartozó *Adcyap1*, illetve *Hbegf* anyai méhszöveti relatív mRNS szintjének összehasonlításához általánosított lineáris kevert modelleket alkalmaztunk. Míg az embriók *Hbegf* relatív mRNS szintjének összehasonlítására általános lineáris kevert

modellt (LME) használtunk. Ezekkel a módszerekkel az ismételt mérések közötti korreláció figyelembe vehető, így a torzított becslések elkerülhetőek (Pinheiro és Bates, 2000). Mindkét elemzési módszer során a random hatás az egyes nőstények azonosítója volt. A modellek alkalmazhatóságának feltételeit (reziduum szóráshomogenitás, reziduumok és random hatások normalitása) diagnosztikai ábrák segítségével ellenőriztük. Az elemzéshez szükséges volt az R statisztikai programhoz letölthető nlme, multcomp és lme4 könyvtárak (J. Pinheiro et al., 2014) használata.

Az embriók *Hbegf* relatív expressziójának és a méhszövet *Adcyap1*, illetve *Hbegf* relatív expressziójának esetleges kapcsolatának megállapításához Pearson-féle korrelációs tesztet végeztünk.

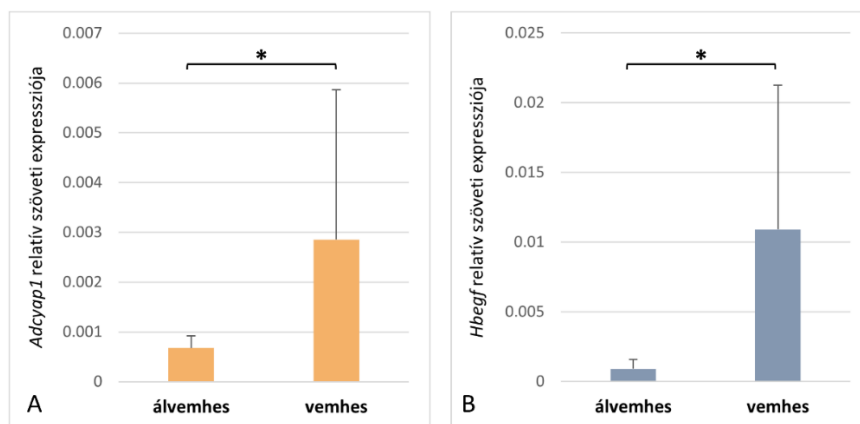
## 7.3.2 Eredmények

### 7.3.2.1 Molekuláris vizsgálataink

Molekuláris vizsgálataink során célul tűztük ki a két peptid real-time PCR-rel való kimutathatóságát. HB-EGF esetén, mind a méhszövetből, mind az embrióból sikeresen megállapítottuk az expresszió mértékét. Ugyanakkor a PACAP esetében csak méhszöveti mintákon tudtunk megállapítani relatív mRNS szinteket.

### 7.3.2.2 Embrió jelenlététől függő szöveti expressziós vizsgálatok

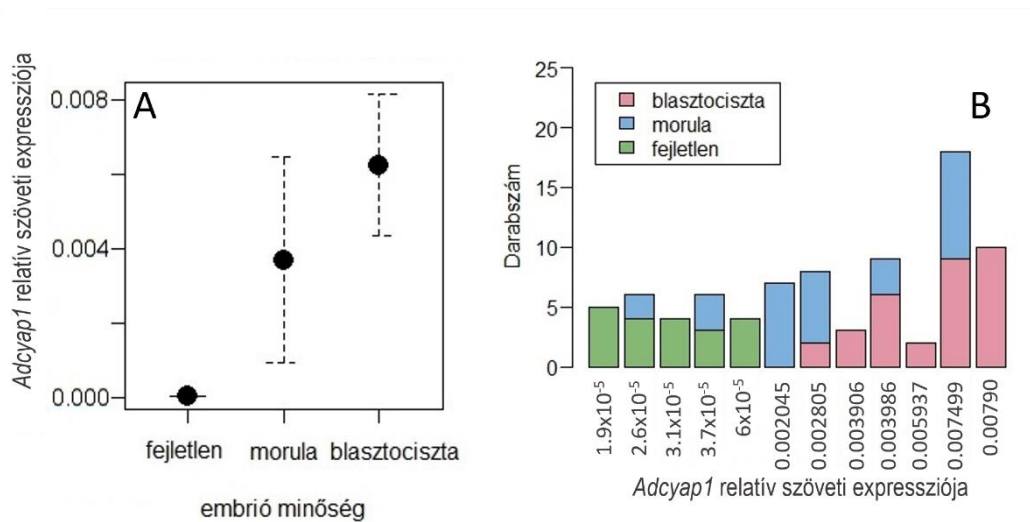
Vizsgálataink során 12 álvemhes és 12 vemhes nőstény méhszöveti mintáját gyűjtöttük be. Mind a PACAP (p-érték = 0,02928) (**18A** ábra), mind pedig HB-EGF (p-érték = 0,006545) (**18B**. ábra) esetében szignifikáns eltérést tapasztaltunk. Ez alapján elmondható, hogy szignifikánsan nagyobb volt az embrióval rendelkező nőstények méhszöveti *Adcyap1* és *Hbegf* relatív expressziója.



18. ábra *Adcyap1* (A) és *Hbegf* (B) relatív mRNS szintje vemhességtől függően (átlag  $\pm$  SD)

### 7.3.2.3 PACAP és HB-EGF hatása az embriófejlődésre

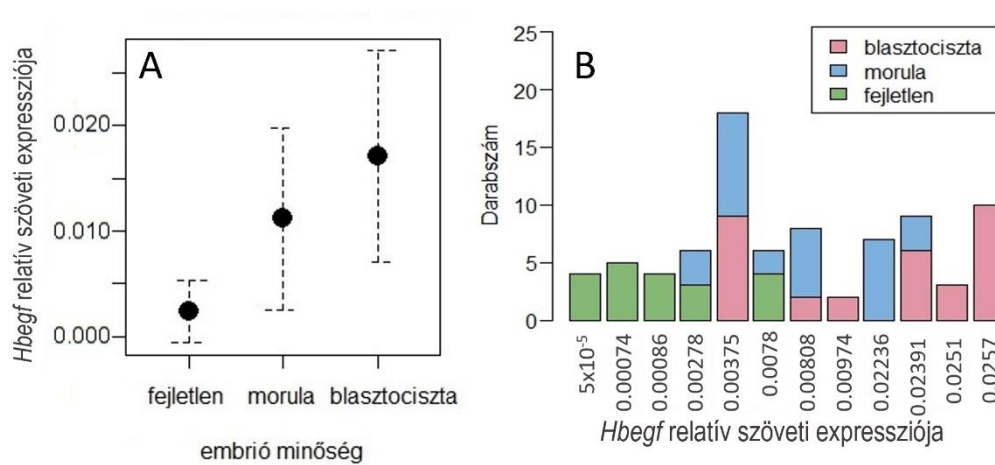
A vemhes nőstényekből 32 blasztociszta, 30 morula és 20 fejletlen embriót nyertünk. A két vizsgált peptid embriófejlődésre gyakorolt hatását az alapján határoztuk meg, hogy az egyes szöveti expressziókhöz milyen fejlettségű embriók tartoznak. PACAP esetében szignifikáns kapcsolatot találtunk, mely azt jelenti, hogy a nőstény méhszöveti expressziójának 0,001-gyel való emelkedésével 3,92-szer nagyobb eséllyel fordulnak elő blasztociszta fejlettségű embriók (95% KI: 1,78-79,03) (**19A, 19B** ábra).



19. ábra (A) A különböző fejlettségű embriókhoz tartozó relatív szöveti *Adcyap1* expresszió (átlag ± SD)

(B) *Adcyap1* relatív mRNS szintjéhez tartozó embriók száma és minősége az egyes nőstényekben

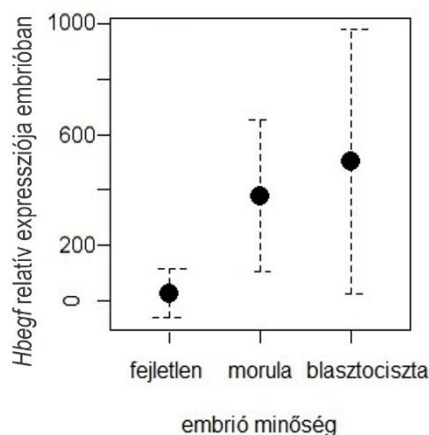
HB-EGF esetében nem találtunk szignifikáns kapcsolatot ( $p=0,1356$ ) az embriók fejlettségi állapota és a szöveti relatív expressziók között (**20A**, **20B** ábra).



20. ábra (A) A különböző fejlettségű embriókhoz tartozó relatív szöveti Hbegf expresszió (átlag ± SD)

(B) Hbegf relatív mRNS szintjéhez tartozó embriók száma és minőség az egyes nőstényekben e

Ugyanakkor szignifikáns eltérés mutatkozott mindhárom fejlettségi csoportban az embriók Hbegf relatív expressziója között. A blasztociszta fejlettségű embriók relatív expressziós szintjei szignifikánsan magasabb volt a morula ( $p=0,0177$ ) és a fejletlen ( $p<0,001$ ) embriókon mért expressziós szintekhez képest, valamint szignifikáns eltérést tapasztaltunk a morula és a fejletlen embriók között is ( $p<0,001$ ). (**21.** ábra).

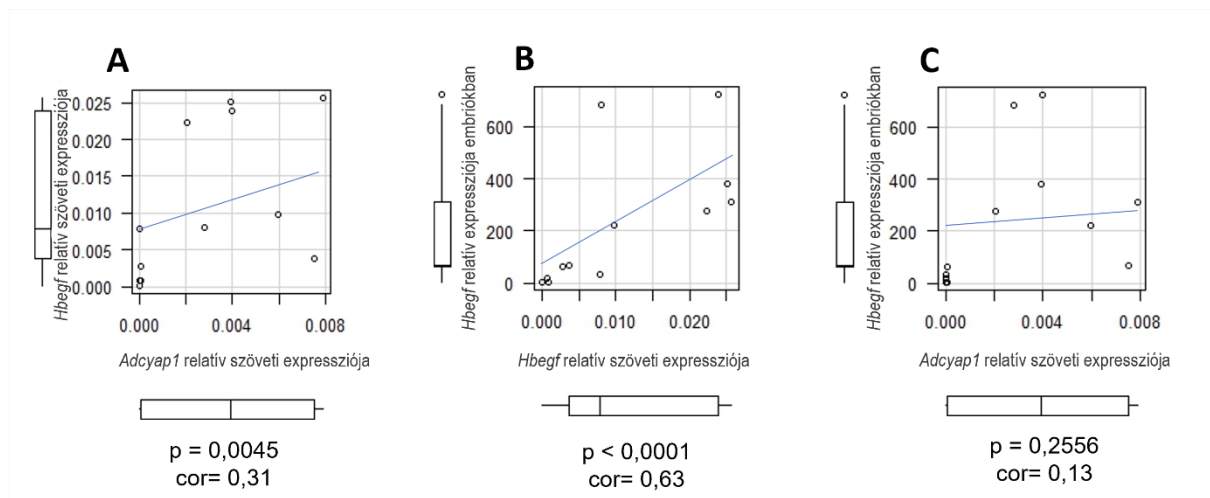


21. ábra HB-EGF relatív mRNS szintje a különböző fejlettségű embriókban (átlag ± SD)

### 7.3.2.4 PACAP és HB-EGF kapcsolatának vizsgálata

A korrelációs együtthatókból gyenge pozitív kapcsolat látszik, mind az *Adcyap1* és a *Hbegf* szöveti relatív expressziója között (korrelációs együttható=0,31) (**22A** ábra), mind pedig a méhszövet és az embriók *Hbegf* relatív expressziója között (korrelációs együttható=0,63) (**22B** ábra). A Pearson-féle korrelációs teszt alapján elmondható, hogy a korrelációs együtthatók szignifikánsan eltérnek a nullától ( $p=0,0045$  és  $p<0,0001$ ).

Ugyanakkor az *Adcyap1* szöveti és az embriók *Hbegf* relatív mRNS szintje közötti korrelációs együttható nem különbözik szignifikánsan a nullától ( $p=0,2556$ ) (**22C** ábra).



22. ábra (A) *Hbegf* relatív szöveti mRNS szintje az *Adcyap1* szintjétől függően  
(B) *Hbegf* relatív mRNS szintje embriókban a *Hbegf* szintjétől függően  
(C) *Hbegf* relatív mRNS szintje embriókban az *Adcyap1* szintjétől függően

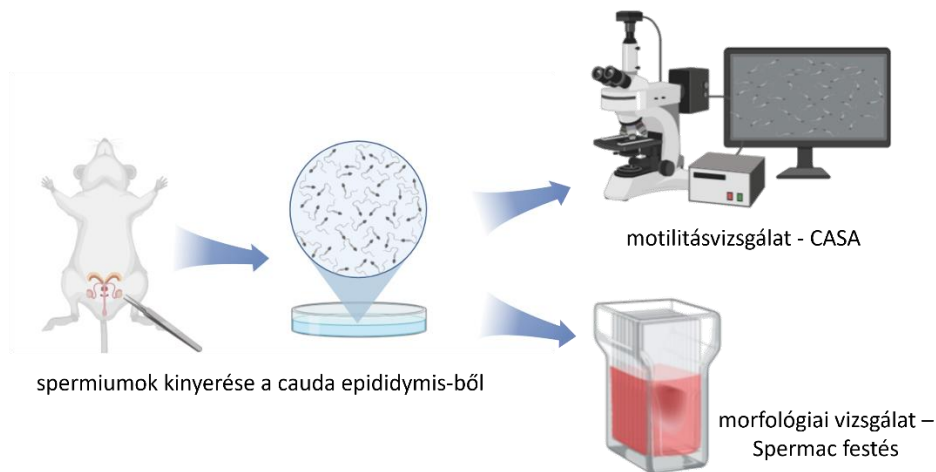
## 8 Endogén PACAP hatásának vizsgálata a hímek reprodukciójára

### 8.1 PACAP hatása a spermiumok motilitására és morfológiájára

#### 8.1.1 Anyag és módszer

##### 8.1.1.1 Spermiumok vizsgálata

A spermiumok vizsgálatához CD1-es egértörzs 14 vad típusú és 12 PACAP KO hím spermiummintáját használtuk fel (PE/EA/1101-7/2017), amelyeket a mellékhere caudalis részéből nyertünk ki. Az eredményeket Olympus BX40 mikroszkóppal állapítottuk meg (23. ábra).

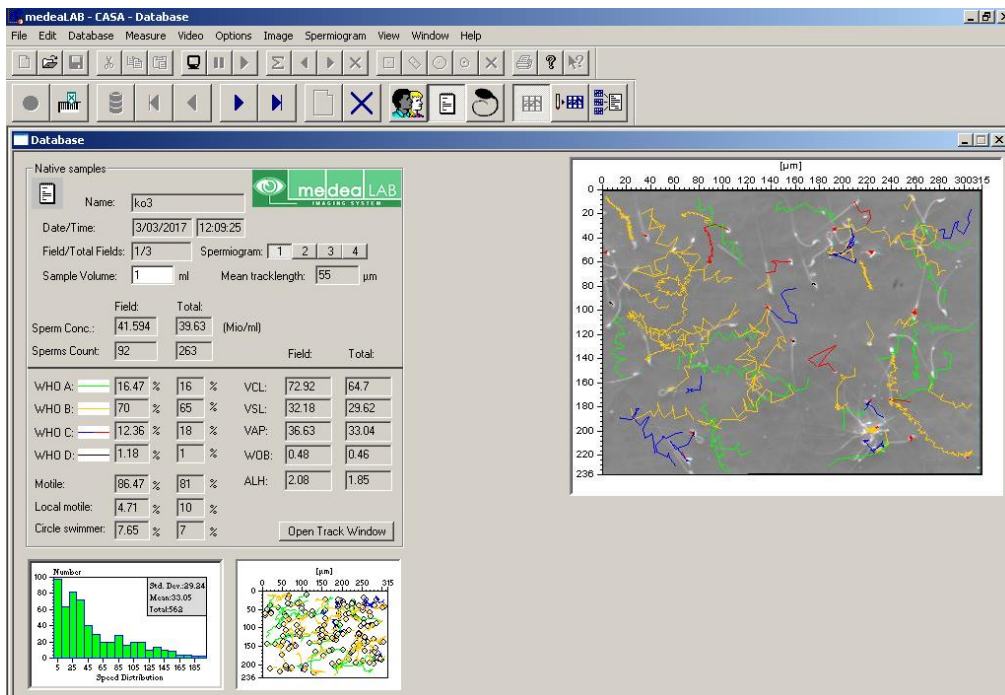


23. ábra Endogén PACAP spermiumokra gyakorolt hatásának vizsgálata

##### 8.1.1.2 Motilitási vizsgálat

A motilitás, a fertilitási képesség egyik legfontosabb indikátora. Jellemzi a spermiumok életképességét és a strukturális integritást. Ezért a motilitásvizsgálat szerves részét képezi a sperma elemzésnek. A Computer-asszisztált sperma analízis (CASA) pontos és objektív értékelést biztosít a különböző spermium motilitásra. Vizsgálataink során mi is a CASA számítógépes programot használtuk. A program méri egy spermium két pont közötti megtett útjának sebességét, a két pont közötti útjának becsült görbájének sebességét, valamint egyenesvonalú mozgását. Ezekből az adatokból, gyorsan mozgó (WHO A), lassan mozgó (WHO B), helyben mozgó (WHO C) és mozdulatlan (WHO D) kategóriákba sorolja a spermiumokat (24. ábra).





24. ábra CASA program mérési képe. Mérés közben a jobb oldali élőképen látható a spermiumok mozgása, majd a mérés végeztével, motilitásuknak megfelelő színjelzést kapnak.

### 8.1.1.3 Morfológiai vizsgálat

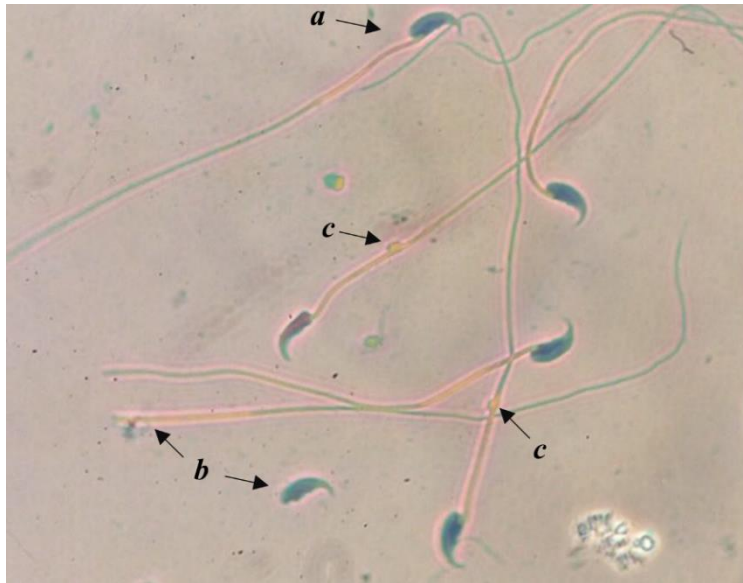
A spermiumok morfológiájának értékelése a spermaelemzés standard eljárása. A Spermac festék (FertiPro; Belgium) (25. ábra) alkalmas a spermiumok morfológiájának részletes vizsgálatára. A morfológiai elemzést 1000x nagyítású objektívvel, olajimmerziós nagyítással végeztük.



25. ábra Kenetek festése Spermac festék A, B illetve C reagens

A mellékheréből kinyert spermiumokból kenetet készítettünk, majd száradás után Spermac fixációs oldattal fixáltuk őket, újabb száradás után desztillált vizes mosás következett. Ezt követően a mintákat A reagensbe helyeztük 1 percre, majd desztillált vízzel leöblítettük. Ezt a folyamatot megismételtük a B illetve C reagenssel is. Végül a megszáradt keneteket immerziós olaj segítségével, Olympus BX40 mikroszkóppal értékeltük ki, a WHO

által elfogadott morfológiai osztályozás alapján (26. ábra). Az adatokat R statisztikai programmal (R Development Core Team, 2016) elemeztük. A két csoportban a spermiumok minőségének összehasonlítására kétmintás t-próbát használtunk.



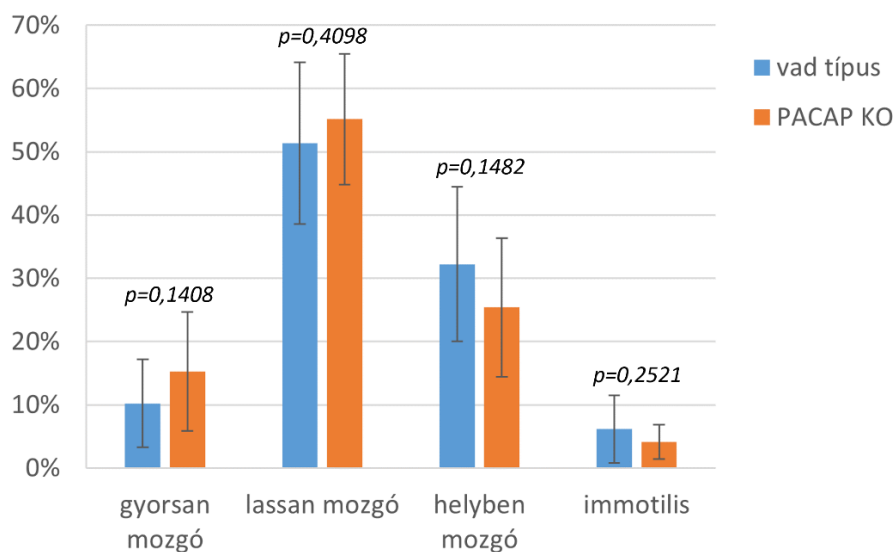
26. ábra Megfestett spermiumok (1000x)

a: normál spermium, b: törött spermium, c: disztális plazmacsepp

## 8.1.2 Eredmények

### 8.1.2.1 Motilitási vizsgálat

A számítógépes spermaanalízissel elvégzett motilitási vizsgálat eredményeit a 27. ábra mutatja. Egyik motilitási kategóriában sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoportban (vad típus n=14, KO n=12).



27. ábra Motilitási arányok a két csoportban (átlag ± SD)

### 8.1.2.2 Morfológiai vizsgálat

Az 3. táblázatban látható a két kezelési csoport (vad típus n=14, KO n=12) spermiumainak morfológiai osztályozása és átlagos arányuk. Nem találtunk szignifikáns különbséget egyik morfológiai rendellenességi mutatóban sem.

3. táblázat Abnormitási arányok a két kezelési csoportban

Osztályozás	p-érték	vad típus átlag [%] ± SD	KO átlag [%] ± SD
normál	0,096	69,92 ± 10,51	54,17 ± 28,85
proximalis plazmacsepp	0,065	5,08 ± 5,09	11,75 ± 10,54
dystalis plazmacsepp	0,073	1,92 ± 2,13	0,6 ± 1,98
törött	0,21	11,08 ± 5,07	25,08 ± 36,11
feltekeredett	0,77	5,54 ± 7,51	4,75 ± 6,03
microcephal	0,18	2 ± 2,23	0,92 ± 1,62
macrocephal	0,68	1,08 ± 1,11	0,83 ± 1,69
acrosoma defekt	0,14	1,69 ± 1,88	0,75 ± 1,05

## 9 Megbeszélés

A PACAP szaporodásbiológiai hatásaival foglalkozó korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a peptid több szinten is hatással van a reprodukcióra. Lee és munkatársai (1999) megfigyelték, hogy gonadotropinok a PACAP mRNS expresszióját fokozzák a preovulatorikus follikulusok granulózasejtjeiben, amely elnyomja a tüsző sejtjeinek apoptózisát és serkenti a preovulatorikus tüszők granulózasejtjeinek progeszteront szekretáló lutein sejtévé történő átalakítását, ezzel serkentve a luteinizációt (Gräs et al., 1999). Ezzel összhangban Isaac és Sherwood (2008) PACAP KO egyedek esetében a petefészek lutein sejtjeinek alacsonyabb progeszteron-termelését figyelték meg. A tapasztalatok azonban ellentmondásosak, mivel nem találtak különbséget az ivarérésben, a párzási viselkedésben, az ovulációban, és a petefészek szövettanában. Hüvelykeneteken végzett megfigyeléseik alapján az ösztrusz ciklusban sem volt különbség (Isaac & Sherwood, 2008), melyet vizsgálataink során RIA módszerrel, szteroidhormonok metabolit szintjeinek mérésével is igazolni tudtunk, ami során nem tapasztaltunk különbséget a PACAP KO és vad típusú nőstények hormontermelése között.

A PACAP preimplantációs embriók fejlődésére gyakorolt hatásának vizsgálata során a szuperovulációs hormonkezelés és párzást követően nyertük ki az embriókat PACAP KO és vad típusú egerekből. A két csoport között a kinyerhető embriók számában nem találtunk különbséget. Ez arra enged következtetni, hogy a PACAP KO és vad típusú egerek egyformán reagáltak a szuperovulációs hormonkezelésre és a termékenyülés folyamata is zavartalan volt mindkét csoportban. Isaac és Sherwood (2008) csökkent beágyazódott embriószámot figyeltek meg PACAP KO egerekben. Mivel esetünkben a preimplantációs embriószámában nem találtunk eltérést, ez alátámasztja Isaac és Sherwood véleményét, miszerint a PACAP fontos szerepet tölthet be a beágyazódásban és hiányában az implantálódó embriók száma, azaz az embriók implantációs képessége csökken. Ezt a mikronukleusz arányra irányuló kísérletünk is alátámasztja, mivel a mikronukleuszok emelkedett számát összefüggésbe hozták az alacsonyabb fejlődési eréllyel és beágyazódási képességgel (Jackson et al., 1998; Moriwaki et al., 2004). Vizsgálatunk során szignifikánsan magasabb mikronukleusz arányt tapasztaltunk a PACAP KO embriókban.

Rágcsálók embrionális fejlődése során részletesen vizsgálták a központi idegrendszerben megjelenő *Adcyap1* expressziót (Shuto et al., 1996; Waschek et al., 1998; Skoglösa et al., 1999; Jaworski & Proctor, 2000; Watanabe et al., 2007). Egér embrió esetében *Adcyap1* mRNS-t legkorábban post-implantációs embrióban, E9,5 napon mutatták ki agyban, ahol az mRNS szintje a prenatális időszak során növekedett, majd születéskor érte el a maximumot (Shuto et al., 1996; Waschek et al., 1998). Az embrionális fejlődés ezutáni szakaszában a

PACAP génje már széles körben expresszáldott (Masuo et al., 1994; Tatsuno & Arimura, 1994; Tatsuno et al., 1994; Shuto et al., 1996; Waschek et al., 1998; Jaworski & Proctor, 2000). A PACAP implantációban betöltött szerepének vizsgálata során, tudomásunk szerint, kísérleteink voltak az első próbálkozások a preimplantációs embriók PACAP szintjének kimutatására. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy nem mutatható ki embrionális expresszió blasztociszta, vagy fejletlenebb embriókból, amely összhangban van Shuto és munkatársainak (1996) valamint Waschek és munkatársainak (1998) korábbi, postimplantációs embriókban végzett vizsgálataival.

Eredményeink magasabb *Adcyap1* és *Hbegr* mRNS-szintet mutattak ki a párosodás után embriókat tartalmazó nőtényekben, mint az álvemhes egyedekben. Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a vemhesség korai szakaszában folyamatosan emelkedő progeszteron növeli a PACAP koncentrációját. Mivel Sulila és munkatársai (1988) nem találtak szignifikáns különbséget vemhes és álvemhes egerek szérumban progeszteron szintjében, így eredményeink arra engednek következtetni, hogy a magasabb *Adcyap1* szint nem korlátozódik a progeszteron által kiváltott serkentő hatásra, az embriók jelenléte is befolyásolja az endometriális *Adcyap1* szintet. Ez az elmélet kommunikációt feltételez az embrió és a méhszövet között. Kísérleteink során fejlettebb embriókhoz magasabb méhszöveti *Adcyap1* expresszió társult, mely szintén a feto-maternális kommunikáció bizonyítéka. Az elemzés azt mutatta, hogy az *Adcyap1* expresszió 0,001-gyel való emelkedése 3,92-szer nagyobb esélyt ad a fejlettebb embrióra.

Spencer és munkatársai (2001) a vemhesség 3-15. napja között 3 naponként vizsgálták a *Adcyap1* mRNS szintjét álvemhes és vemhes patkányok decíduális endometriumában. Az expresszió szintje a 3. napon nulla volt, míg a 6. napon mind az álvemhes, mind a vemhes nőtényeknél jelentős növekedést észleltek. Vizsgálataink során, a párzást követő 4. napon mértük a méhszöveti expressziót és ekkor csak a vemhes nőtényekben találtunk emelkedett *Adcyap1* szintet. Piekorz és munkatársai (2005) megfigyelték, hogy a progeszteron a párzást követő 6. napon éri el csúcsát, és a drasztikus emelkedés a 4-6. nap között kezdődik. Ez arra enged következtetni, hogy a vemhesség előrehaladtával, azaz a progeszteronszint növekedésével a magasabb progeszteronszint elegendő az expresszió kiváltásához, embrió jelenlététől függetlenül, és álvemhes nőtényekben is megjelenik az *Adcyap1* expresszió. Ezt alátámasztja Oride és munkatársainak (2016) eredményei, akik vizsgálatuk során patkány placenta sejteket kezelték 10  $\mu$ M progeszteronnal *in vitro*, ami emelkedett *Adcyap1* mRNS-expressziót eredményezett.

A blasztociszta az anyai környezettel való találkozáskor kétirányú kommunikációt kezdeményez néhány órával az implantáció előtt. A HB-EGF először a terhesség 4. napján 16

óra körül (100 óra hCG után) jelenik meg a blasztocisztával szomszédos hámsejtekben (Lim & Dey, 2009). Ez alátámasztja a vemhes és álvemhes nőstények *Hbegf* expressziójában általunk tapasztalt különbséget. Ahogyan Wang és munkatársai (2000) tanulmánya mutatja, az endometrium a HB-EGF által jelez vissza az embriónak, hogy aktiválja a trophoblast-differenciálódást. Ez a folyamat a későbbi kapcsolódás és penetráció során szükséges, és csak akkor megy végbe, ha megfelelően fejlett embriók (blasztociszták) vannak jelen. A szöveti és embrionális *Hbegf*-expresszió összefüggésére vonatkozó eredményeink is megerősítik ezt az elméletet. Ezenfelül a *Hbegf* mRNS alacsony szintjét találtuk a nem kompakt embriókban, míg a morulák és különösen a blasztociszták nagy mennyiségű *Hbegf* mRNS-t expresszáltak. Ezek az adatok összhangban vannak a korábbi vizsgálatokkal (Seshagiri et al., 2002; Lim et al., 2006), ahol a HB-EGF pozitív hatását mutatták ki a preimplantációs embrió fejlődésére és a zona pellucidából való kibújásra. Továbbá pozitív korrelációt találtunk az *Adcyap1* expresszió és a méh *Hbegf* expressziója között, ami a PACAP szerepére utal a korai vemhesség során és a periimplantációs időszakban. Ezt Oride és munkatársainak (2016) vizsgálata is alátámasztja, akik megállapították, hogy a PACAP-kezelés a megnövekedett hCG mRNS-expresszió keresztül serkentette a hCG-termelődést. A HB-EGF-hez hasonlóan a hCG is a periimplantációs időszakban éri el a legmagasabb szintjét és hozzájárul az endometrium receptivitásához (Makrigiannakis et al., 2017). A megnövekedett HB-EGF-szintek szintén az implantáció előtti és alatti feto-maternális kommunikáció bizonyítékai (Zhang et al., 2013). Tudomásunk szerint a mi adataink szolgáltatják az első bizonyítékot a különböző méhszöveti *Adcyap1*-expressziós szintek lehetséges szerepére a beágyazódásban, és először mutatnak korrelációt a PACAP és a HB-EGF, a beültetésben szerepet játszó növekedési faktor között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PACAP szerepet játszhat a korai egérembrió fejlődésének periimplantációs időszakában. Ugyanakkor nem tapasztaltunk korrelációt a szöveti *Adcyap1* és az embrionális *Hbegf* között, ami arra utal, hogy a PACAP-nak nincs, vagy korlátozott hatása van az embriók HB-EGF-termelésére ebben az időszakban. Ez a hipotézis azonban további vizsgálatokat igényel.

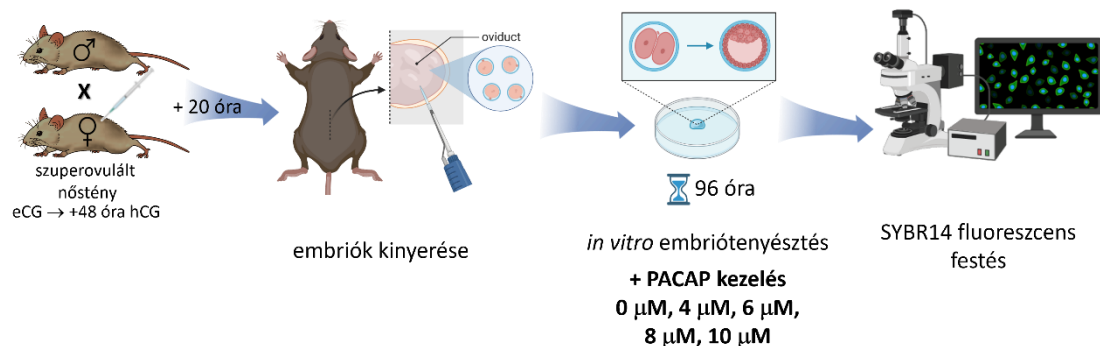
Hím egerek vizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést sem spermiumok motilitásában sem morfológiájában. Így feltételezhetően az endogén PACAP-nak sokkal inkább a fertilizációs folyamat során lehet szerepe. Lokalizációja arra utal, hogy a cumulus sejtrétegen való áthaladás során játszik szerepet (Tanii et al., 2011), valamint a hím nemi működéshez elengedhetetlen tesztoszteron szekréciót stimulálja dózis függő módon (Rossato et al., 1997; El-Gehani et al., 1998), ugyanakkor a spermiumok motilitására és morfológiájára nincs hatással.

## 10 Exogén PACAP felhasználási lehetőségei az asszisztált reprodukciós eljárások során

### 10.1 Exogén PACAP hatása a preimplantációs embriók minőségére az *in vitro* embriótenyésztés során

#### 10.1.1 Anyag és módszer

Vizsgálataink során BDF1 egértörzset használtunk (PE/EA/1062-6/2021). A nőstény egereket szuperovuláltattuk (7,5 NE eCG; 7,5 NE hCG). A hCG injekciót követően egy éjszakára a nőstény egereket hímekhez (1 nőstény / 1 hím) helyeztük. A zigótákat a párzást követő reggelen, sztereomikroszkóp alatt, a petevezeték ampulla részéből nyertük ki a nőstényekből (n=15). Az embriók kinyeréséhez speciális tápfolyadékot használtunk (PBS + 20% FBS [Sigma-Aldrich; Kanada]). Az embriókat több rétegben körülvevő cumulus sejteket hialuronidáz (Sigma-Aldrich; Kanada) enzim segítségével távolítottuk el. A megtisztított embriókat véletlenszerűen elosztva, különböző koncentrációkban (0  $\mu\text{M}$  [kontroll csoport], 4  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , valamint 10  $\mu\text{M}$ ) PACAP-pal kiegészített G-1™ PLUS tápfolyadékokba (Vitrolife; Svédország) helyeztük. Majd 96 órán keresztül *in vitro* tenyésztettük őket (n=296) a megfelelő körülményeket biztosítva (37,5 °C, 6,5% CO<sub>2</sub>, maximális páratartalom) (28. ábra).



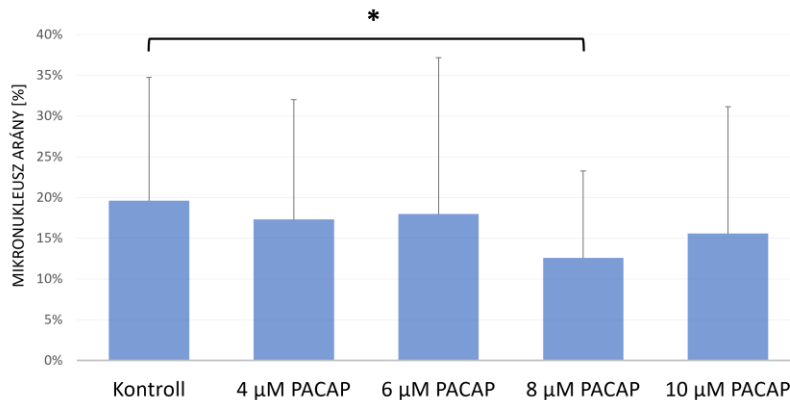
28. ábra Exogén PACAP hatásának vizsgálata az *in vitro* embriótenyésztés során

A tenyésztést követően meghatároztuk a blasztociszták mikronukleusz arányát. Ehhez SYBR14 festéket használtunk a 7.2.1.2 fejezetben részletezett módon. Vizsgálatunk során, kezelési csoportonként 43, összesen 215 embriót festettünk meg és értékeltünk ki.

Az adatokat az R v3.0.0 szoftverrel (R Development Core Team) elemeztük. A mikronukleusz arányok összehasonlítására Kruskal-Wallis-próbát, majd a csoportok páronkénti összehasonlítására post hoc Wilcoxon-próbát használtunk (p-adjustment method: Benjamini & Hochberg, 1995).

### 10.1.2 Eredmények

Vizsgálataink során a Kruskal-Wallis-próba szignifikáns eredményt mutatott ( $p=0,032$ ). A post hoc elemzés alapján szignifikánsan alacsonyabb mikronukleusz arányt tapasztaltunk a 8  $\mu\text{M}$  PACAP-pal kezelt embrióknál a kontroll csoporthoz képest ( $p = 0,037$ ). Míg a többi kezelési csoport esetében nem találtunk szignifikáns eltérést (29. ábra).



29. ábra Mikronukleuszok aránya az egyes kezelési csoportokban (átlag  $\pm$  SD)

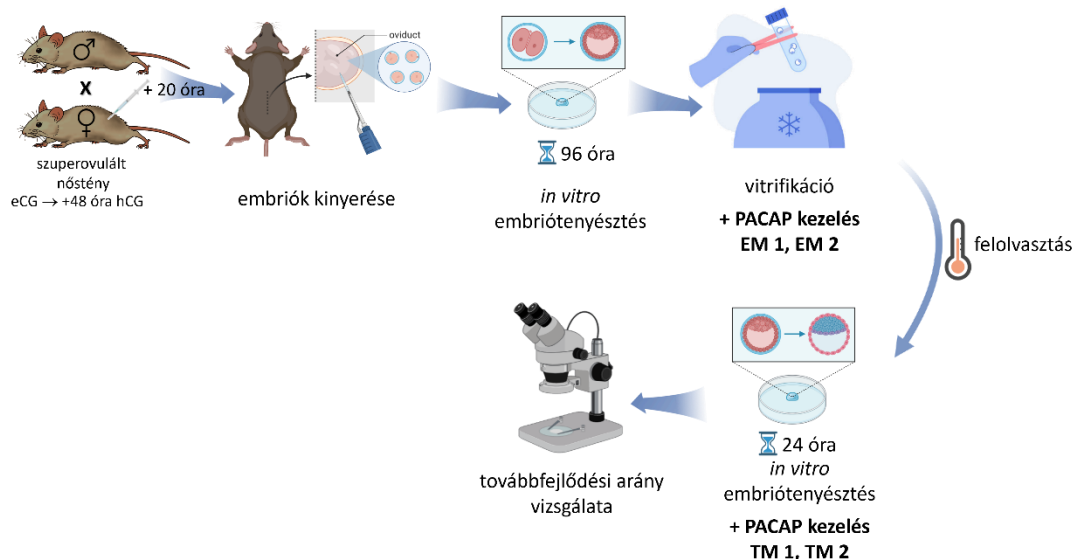
## 10.2 Exogén PACAP hatása a vitrifikáció utáni túlélésre és továbbfejlődésre

### 10.2.1 Anyag és módszer

#### 10.2.1.1 Embriók előállítása

Kísérletünkhöz BDF1 egértörzset használtunk (PE/EA/1062-6/2021). Vizsgálataink során a nőtény egereket szuperovuláltattuk. Ennek során intraperitoneálisan 7,5 NE eCG injekcióval, majd 48 óra elteltével 7,5 NE hCG-vel (mindkettő Alvetra und Werfft AG; Ausztria) kezeltük őket. A hCG injekciót követően a nőtény egereket egy éjszakára hímekhez helyeztük (1 hím / 1 nőtény). A zigótákat a párzást követő nap reggelén PBS + 20% FBS oldat segítségével nyertük ki a petevezeték ampulláris részéből, majd 72 órán keresztül G-1™ PLUS médiumban *in vitro* tenyésztettük (37,5 °C, 6,5% CO<sub>2</sub>, maximális páratartalom). A tenyésztést követően sztereomikroszkóp (Olympus SZX7) segítségével, az embriók morfológiai jellegzetességeik alapján megállapítottuk a fejlettségi állapotukat és minőségüket. További vizsgálatainkhoz csak a blastociszta fejlettségi állapotú, Grade 1 minőséggel bíró embriókat használtuk, amelyeket véletlenszerűen osztottunk szét a kezelési csoportok között. Vizsgálatunk során 23 nőtényből, 462 embriót tenyésztettünk és 347 Grade I. embriót vitrifikáltunk (30. ábra).





30. ábra Exogén PACAP hatásának vizsgálata embriók vitrifikációja során  
 EM1, EM2: Equilibrációs Médium 1, illetve 2  $\mu\text{M}$  PACAP kiegészítéssel  
 TM1, TM2: Tenyésztő Médium 1, illetve 2  $\mu\text{M}$  PACAP kiegészítéssel

### 10.2.1.2 Kezelési csoportok

Az embriókat az alábbi kezelési csoportokba osztottuk:

Kontroll csoport:

*Vitrifikált kontroll csoport:* az embriók kiegészítő kezelés nélkül 72 órán keresztül *in vitro* tenyésztettük G-1<sup>TM</sup> PLUS médiumban és a későbbiekben részletezett vitrifikációs protokoll szerint vitrifikáltuk, majd *in vitro* tenyésztettük őket Tenyésztő Médiumban (TM, G-2<sup>TM</sup> PLUS, Vitrolife; Svédország), kiegészítő kezelés nélkül.

PACAP kezelt csoportok:

#### 1. PACAP kezelés a vitrifikációs protokoll során:

1.1 *Equilibrációs Médium kiegészítése 1  $\mu\text{M}$  PACAP-pal (EM 1):* A vitrifikáció előkészítése során az equilibrációs médiumot 1  $\mu\text{M}$  PACAP-pal egészítettük ki. A felolvasztást követően 24 órán keresztül TM-ben kiegészítő kezelés nélkül tenyésztettük.

1.2 *Equilibrációs Médium kiegészítése 2  $\mu\text{M}$  PACAP-pal (EM 2):* A vitrifikáció előkészítése során az equilibrációs médiumot 2  $\mu\text{M}$  PACAP-pal egészítettük ki. A felolvasztást követően 24 órán keresztül TM-ben kiegészítő kezelés nélkül tenyésztettük.

2. PACAP kezelés a vitrifikációt és felolvasztást követő *in vitro* tenyésztés során:

2.1 Tenyésztő médium kiegészítése 1  $\mu\text{M}$  PACAP-pal (TM 1): Az embriókat PACAP kezelés nélkül vitrifikáltuk, majd felolvasztás után 1  $\mu\text{M}$  PACAP-pal kiegészített tenyésztő médiumban *in vitro* tenyésztettük őket 24 órán keresztül.

2.2 Tenyésztő médium kiegészítése 2  $\mu\text{M}$  PACAP-pal (TM 2): Az embriókat PACAP kezelés nélkül vitrifikáltuk, majd felolvasztás után 2  $\mu\text{M}$  PACAP-pal kiegészített tenyésztő médiumban *in vitro* tenyésztettük őket 24 órán keresztül.

A kezelési csoportok összefoglaló táblázatát a 4. táblázat mutatja.

4. táblázat EM 1: Equilibrációs Médium kiegészítése 1 $\mu\text{M}$  PACAP-pal, EM 2: Equilibrációs Médium kiegészítése 2 $\mu\text{M}$  PACAP-pal, TM 1: Tenyésztő Médium kiegészítése 1 $\mu\text{M}$  PACAP-pal, TM 2: Tenyésztő Médium kiegészítése 2 $\mu\text{M}$  PACAP-pal

Csoport neve	Vitrifikáció	Equilibrációs Médium + PACAP	Tenyésztő Médium + PACAP
Vitrifikált kontroll	✓	-	-
EM 1	✓	1 $\mu\text{M}$	-
EM 2	✓	2 $\mu\text{M}$	-
TM 1	✓	-	1 $\mu\text{M}$
TM 2	✓	-	2 $\mu\text{M}$

### 10.2.1.3 Vitrifikáció

A 72 órás *in vitro* tenyésztést követően meghatároztuk az embriók fejlettségi állapotát és minőségét morfológiai jellemzőjük alapján sztereomikroszkóp segítségével. Ez alapján 347 db, Grade 1 minősítést kapott embriók kerültek vitrifikálásra. Az embriókat először Holding Médiumban (HEPES-modified Medium 199 (Thermo Scientific, USA) + 20% FBS) mostuk át, majd 3 percig Equilibrációs Médiumban (EM: Holding Médium + 7.5% (EG) + 7.5% DMSO (mindkettő Sigma-Aldrich; Kanada) inkubálódtak szobahőmérsékleten. Ezután az embriók Vitrifikációs Médiumba (VM: HEPES-modified Medium 199 + 1M szukróz + 20% FBS + 16.5% EG + 16.5% DMSO) kerültek 20 másodpercre. OPS (open pulled straw) segítségével összegyűjtöttük őket, és folyékony nitrogénbe mártottuk. A vitrifikált mintákat 1 hétig folyékony nitrogénben tároltuk.

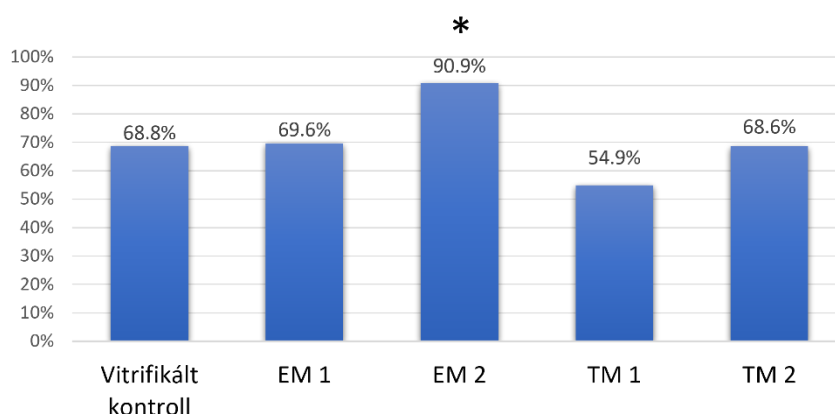
#### 10.2.1.4 Felolvasztás és *in vitro* tenyésztés

A felolvasztás során az embriókat Holding Médium + 50% szukróz médiumban (SM) (HEPES-modified Medium 199 + 1M szukróz + 20% FBS) mostuk 5 percig, majd fokozatosan csökkentettük az SM koncentrációját a további mosási lépések során. Végül az embriókat Holding Médiumba gyűjtöttük. A felolvasztási protokoll után 24 órára TM-be helyeztük őket. 24 óra elteltével meghatároztuk a továbbfejlődési arányt, amely a re-expandált és tovább fejlődött embriók számának és a kezelési csoportban fagyasztott embriók számának százalékos aránya.

Az adatokat R statisztikai programmal (R Development Core Team Version 1.0.153, 2017) elemeztük. A kontroll és a kezelési csoportok továbbfejlődési arányának összehasonlítására Khi-négyzet próbát használtunk.

#### 10.2.2 Eredmények

Az EM 2 csoportban 90,9% (50/55) volt a továbbfejlődési arány, amely szignifikánsan magasabb a Vitrifikált kontrollhoz képest (68,8%, 44/64,  $p=0,0031$ ). Valamint szignifikánsan magasabb, mint az EM 1 (69,6%, 39/56,  $p<0,00019$ ), TM 1 (54,9%, 56/102,  $p<0,0001$ ) és TM 2 (68,8%, 48/70,  $p=0,0026$ ) csoportokban megfigyelt továbbfejlődési arányok (31. ábra). Többi csoport esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.



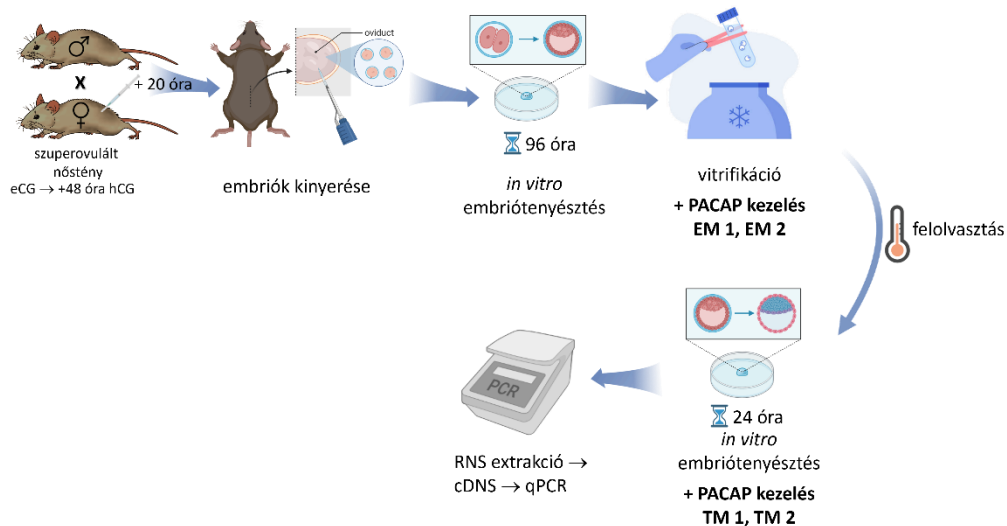
31. ábra Továbbfejlődési arány az egyes csoportokban \*  $p<0,005$

EM 1: Equilibrációs Médium kiegészítése  $1\mu\text{M}$  PACAP-pal, EM 2: Equilibrációs Médium kiegészítése  $2\mu\text{M}$  PACAP-pal, TM 1: Tenyésztő Médium kiegészítése  $1\mu\text{M}$  PACAP-pal, TM 2: Tenyésztő Médium kiegészítése  $2\mu\text{M}$  PACAP-pal

## 10.3 Exogén PACAP hatása az implantációs esélyre

### 10.3.1 Anyag és módszer

Az exogén PACAP implantációs esélyre kifejtett hatásra *Hbegf* expressziós szintből következtettünk. Az embriók előállítás és *in vitro* tenyésztése a 10.2.1.1 fejezetben leírtak alapján történtek. Vizsgálatunk során 10.2.1.3 fejezetben leírt vitrifikációs – és 10.2.1.4 fejezetben részletezett felolvasztási és *in vitro* tenyésztési protokoll szerint kezeltük az embriókat a 10.2.1.2 fejezetben részletezett kezelési csoportok szerint, kiegészítve Friss kontroll csoporttal. A Friss kontroll csoport esetén az embriókat kiegészítő kezelés nélkül 72 órán keresztül *in vitro* tenyésztettük G-1™ PLUS médiumban, majd a 3. napon Tenyésztő Médiumba (TM, G-2™ PLUS, Vitrolife; Svédország) helyeztük őket 24 órára. A *Hbegf* expressziós szint meghatározásához a molekuláris biológiai vizsgálatokat a 7.3.1.3 fejezetben részletezett protokoll alapján végeztük, kezelési csoportonként 30, összesen 200 Grade 1 minőségű embriót, melyet sztereomikroszkóp segítségével, az embriók morfológiai jellemzői alapján határoztunk meg (32. ábra).



32. ábra Exogén PACAP hatásának vizsgálata az implantációs esélyre, vitrifikáció során való alkalmazásakor

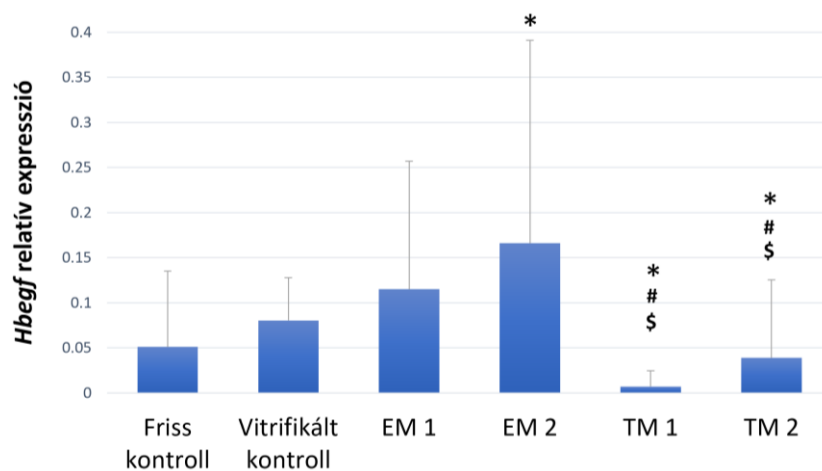
EM1, EM2: Equilibrációs Médium 1, illetve 2  $\mu\text{M}$  PACAP kiegészítéssel

TM1, TM2: Tenyésztő Médium 1, illetve 2  $\mu\text{M}$  PACAP kiegészítéssel

Az adatokat az R v3.0.0 szoftverrel (R Development Core Team) elemeztük. A *Hbegf* relatív expressziós szintek összehasonlítására Kruskal-Wallis-próbát, majd a csoportok páronkénti összehasonlítására post hoc Wilcoxon-próbát használtunk (p-adjustment method: Benjamini & Hochberg, 1995)

### 10.3.2 Eredmények

Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Friss és a Vitrifikált kontroll, valamint az EM 1 embrióknál mért *Hbegf* expressziós szintekben. Ugyanakkor szignifikánsan magasabb relatív *Hbegf* expressziós szintet figyeltünk meg a vitrifikációs protokoll közben nagyobb dózisú PACAP-pal kezelt embriókban (EM2) a Friss kontroll csoport embrióihoz képest ( $p=0,01265$ ). Szignifikánsan alacsonyabb szintet mértünk a vitrifikáció után PACAP-pal kezelt (TM1, TM2) csoportok embrióinál a többi csoporthoz képest, de a két PACAP dózis között nem volt különbség (33. ábra).



33. ábra A *Hbegf* relatív embrionális expressziójának átlagai ( $\pm$  SD) az egyes kezelési csoportokban.

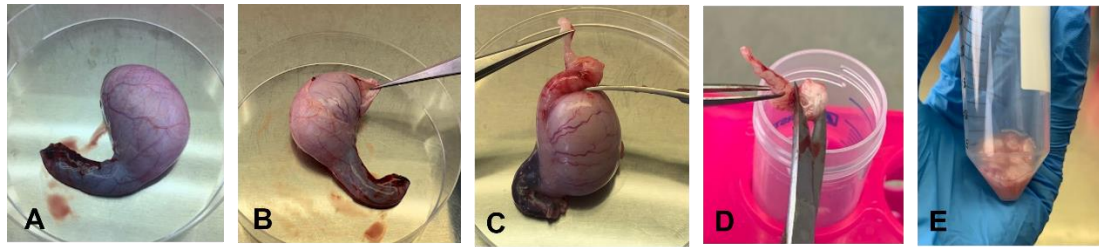
\*  $< 0,05$ , összehasonlítva a Friss kontroll csoporttal

\*, #, \$  $p < 0,05$ , összehasonlítva a Friss kontroll, a Vitrifikált kontroll és a fagyasztás során PACAP-kezelt (EM) csoportokkal.

## 10.4 Exogén PACAP hatása a spermiumok mélyhűtése során

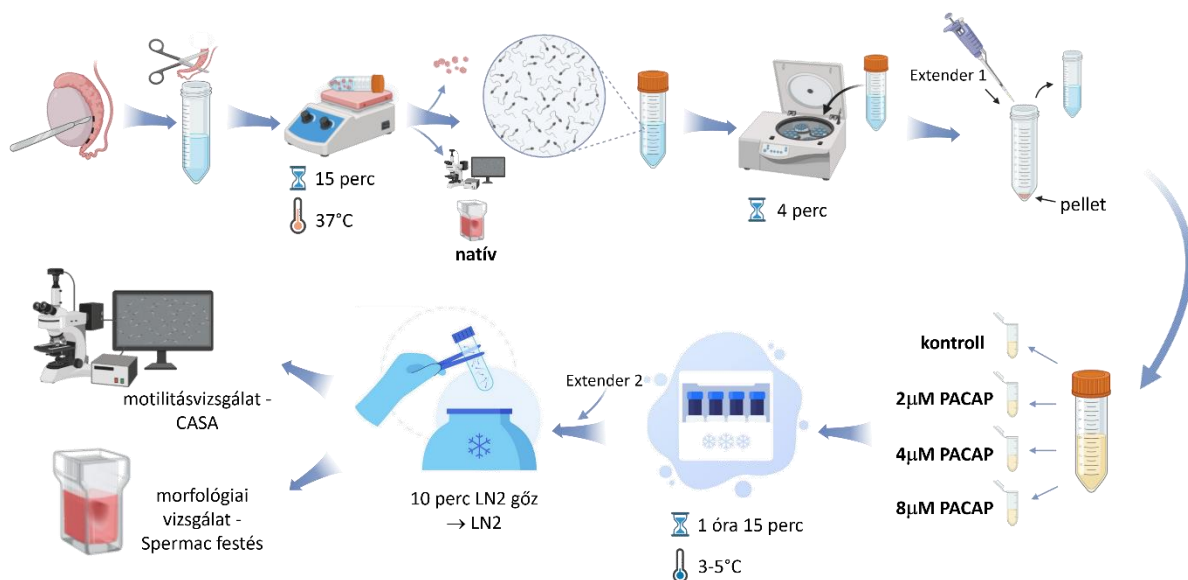
### 10.4.1 Anyag és módszer

Az exogén PACAP spermiumok mélyhűtése során való alkalmazhatóságának vizsgálatát a nagyobb volumen és a kevésbé invazív beavatkozás, valamint a veszélyeztetett fajták génmegőrzésének indokoltsága miatt kutyák mellékheréjéből nyert spermiumokon végeztük ( $n=18$ , ismeretlen fajtájú, keverék kutyák), melyhez a szükséges mintákat a Szülészeti Klinika menhelyi kutyák ivartalanítását célzó programjából kaptuk. A mélyhűtéshez CaniRep Uppsala Equex II (CaniRep; Svédország) 2 lépcsős hígítót használtunk. A minták beérkezését követően a mellékhere caudalis részét leválasztottuk a herékről, majd 2 ml PBS + 20% FBS oldatba daraboltuk (34. ábra).



34. ábra Epididymis preparálása és spermiumok kinyerése

Ezt követően 37°C-os melegítő tárgyasztalon inkubáltuk 15 percen keresztül, hogy kinyerhessük a spermiumokat. A cauda epididymis darabokat eltávolítottuk a folyadékból, és 4 percig 700 g-n centrifugáltuk, majd leszívtuk a felülúszót. A pelletet feloldottuk 2 ml Extender 1. hígítóban. A spermiumban gazdag oldatot 4 felé osztottuk és kezelési csoportnak megfelelően 0  $\mu$ M (Kontroll csoport), 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M PACAP-ot adtunk az oldathoz, majd a gyártó protokollja alapján 1 óra 15 percen keresztül 3-5°C-on equilibráltuk. Ezt követően 1:1 arányban hozzáadtuk a szintén 3-5 °C inkubált Extender 2. hígítót, majd a mintákat szalmákba töltöttük. 10 percre folyékony nitrogén gőzbe helyeztük. Az idő leteltével a mintákat folyékony nitrogénbe mártottuk, majd 1 héten keresztül mélyhűtött állapotban tároltuk. A minták felolvasztása 37°C-os vízfürdőben történt. Majd elvégeztük a motilitási és morfológiai vizsgálatokat (35. ábra).



35. ábra Exogén PACAP hatásának vizsgálata spermiumok mélyhűtése során

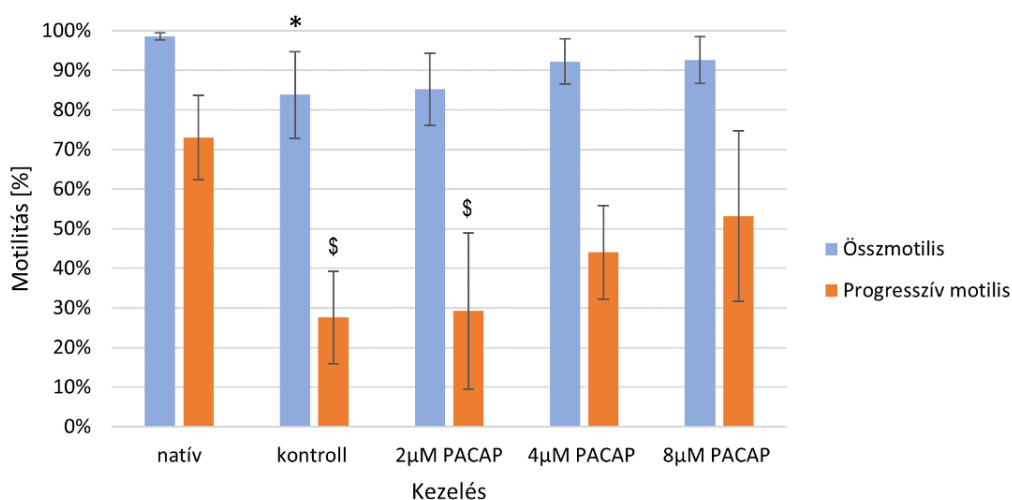
### 10.4.1.1 Morfológiai és motilitási vizsgálat

Mivel a motilitás és a morfológia az egyik legfontosabb jellemzője a fertilitási képességnek, ezért a krioprezerváció sejtkárosító hatásával szemben alkalmazott PACAP mélyhűtés során kifejtett, spermiumok minőségére gyakorolt hatásának vizsgálatához natív és felolvasztás utáni motilitási illetve morfológiai adatokat mértünk. Ehhez a preparálást követő 15 perces inkubációt követően, – vizsgálataink során ez szolgált natív kontrollként – valamint felolvasztást követően is megmértük a motilitásukat, valamint kenetet készítettünk a morfológiai kiértékeléshez. A spermiumok motilitásának vizsgálatához CASA programot használtunk a 8.1.1.2 fejezetben leírtak alapján. A keneteket pedig a 8.1.1.3 fejezet alapján Spermac festékkel (FertiPro; Belgium) festettük.

Az adatokat R statisztikai programmal (R Development Core Team Version 1.0.153, 2017) elemeztük. A vizsgált csoportok motilitás- és akroszóma arányának összehasonlítását varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük. A csoportok páronkénti összehasonlítására post hoc Tukey-próbát használtunk.

### 10.4.2 Eredmények

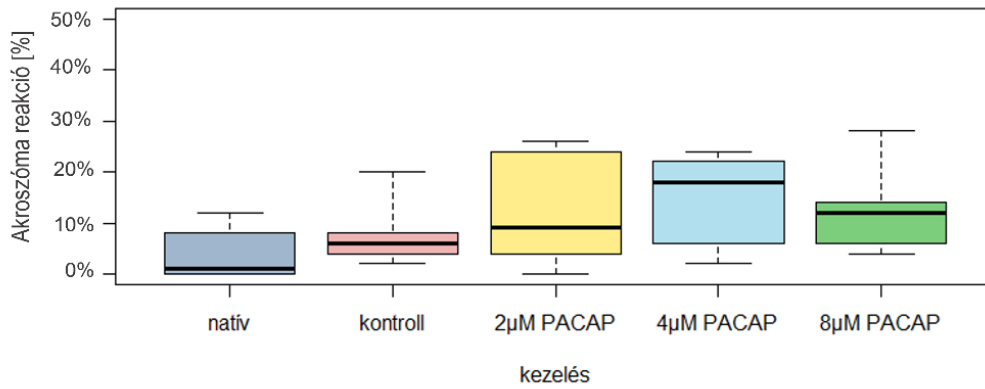
Vizsgálataink során szignifikánsan alacsonyabb összmotilitást tapasztaltunk a kontrollcsoportban a fagyasztás előtti, natív összmotilis értékekhez képest ( $p=0,034$ ), progresszív motilitás esetén pedig szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kontroll ( $p=0,0015$ ) és a  $2\ \mu\text{M}$  PACAP-pal kezelt csoportban ( $p=0,0023$ ) a natív mintákhoz képest. Ezzel szemben a  $4\ \mu\text{M}$  és  $8\ \mu\text{M}$  PACAP-pal kezelt csoportok össz- és progresszív motilitása nem különbözött szignifikánsan a natívan mért motilitástól (36. ábra).



36. ábra Össz- és progresszív motilitás az egyes csoportokban (átlag ± SD)

\*, \$ < 0,05 a natív összmotilitáshoz illetve a natív progresszív motilitáshoz képest

Morfológiai vizsgálataink alapján sem a normál morfológiát, sem az akroszóma reakciót mutató spermiumok arányában (**37. ábra**) nem volt szignifikáns eltérés az egyes csoportok között.



37.ábra Akroszóma reakciót mutató spermiumok aránya az egyes csoportokban



## 11 Megbeszélés

Kutatásunk során megvizsgáltuk az exogén PACAP alkalmazhatóságának lehetőségét a preimplantációs embriók *in vitro* tenyésztése során. Alacsonyabb arányú mikronukleuszt, azaz töredezett DNS állományt tapasztaltunk a 8  $\mu\text{M}$  PACAP-pal kezelt embriók esetében a kontroll csoporthoz képest. Lee és munkatársai (1999) vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a PACAP kezelés dóziszfüggő módon gátolja az apoptotikus DNS fragmentációt a tüszőkben, melyet Vaudry és munkatársai (2003) is megfigyeltek kisagyi szemcsesejteken, ahol a PACAP növelte az élő sejtek számát és gátolta a DNS fragmentációt. Vizsgálatunk alátámasztja ezen megfigyeléseket, mely során a PACAP kezelés dóziszfüggő módon csökkentette a mikronukleusz arányt, amely alacsonyabb DNS fragmentációra utal. A mikronukleuszok emelkedett arányát összefüggésbe hozták a blasztociszta-fejlődés csökkenő arányával, illetve megakadásával, valamint a gyenge beágyazódási sikerrel, és a terhességek során megjelenő magasabb rendellenességek arányával. (Cecchele et al., 2022; Ebner et al., 2001; Jackson et al., 1998b; Stone et al., 2005) Ennek csökkent jelenléte a 8  $\mu\text{M}$  PACAP-pal kezelt embriók jobb minőségére és sikeresebb beágyazódására enged következtetni.

PACAP antiapoptotikus hatásának kihasználása érdekében megvizsgáltuk a vitrifikáció során való alkalmazhatóságát. Eredményeink azt mutatják, hogy a nagyobb dózisú PACAP-pal kezelt embriók csoportjában magasabb volt a továbbfejlődési arány a vitrifikáció után. Ahn és munkatársai (2002) fizikai és kémiai változásokat figyeltek meg a fagyasztott, kiolvasztott, kétsejtes egérembriókban, például a sejtmembrán integritásának pusztulását, az aktin filamentek újrendeződését, mitokondriális depolarizációt és a reaktív oxigéngyökök (ROS) fokozott termelését, amelyek apoptotikus kaszkádot indíthatnak el, ami az embriók túlélési- és továbbfejlődési arányának csökkenéséhez vezethet. Számos más tanulmányban is megfigyelték, hogy az oxidatív stressz korai fejlődési károsodással és az embrió fragmentációjával jár együtt, valamint apoptózist indukál az oocitákban és a korai embriókban (Takahashi et al., 2000; Dennerly, 2007; Takahashi, 2012). Dhali és munkatársai (2007) alacsonyabb blasztociszta arányt találtak a vitrifikált, valamint a nem vitrifikált, de krioprotektív szerrel kezelt embriókban a kontrollcsoporthoz képest. Ez arra utal, hogy a krioprotektáns anyag toxicitása és/vagy a dehidratációs és ozmotikus események jelentősen károsítják az embriókat. Vizsgálatunkban a 2  $\mu\text{M}$  PACAP-pal inkubált (EM 2) majd vitrifikált embriókban szignifikánsan nagyobb arányú felolvasztás utáni fejlődést találtunk a vitrifikált kontrollcsoporthoz képest. Ha azonban a PACAP-ot a felolvasztás után az *in vitro* tenyésztés során (TM 1, TM 2) használtuk, nem találtunk szignifikáns különbséget a fejlődési ütemben a vitrifikált kontroll embriókhoz képest, feltételezhető, hogy a PACAP jelenléte az EM-ben történő 3 perces inkubáció során felkészítette az embriókat arra, hogy jobban ellenálljanak a kriokonzerválás káros hatásainak, sőt védőhatást fejtett ki az ezt követő 24 órás felolvasztás

utáni *in vitro* tenyésztés során. Ezzel szemben a PACAP jelenléte a kiolvasztás utáni *in vitro* tenyésztő médium (TM) során használt közegben nem eredményezett további előnyt. Megfigyelésünk arra utal, hogy a PACAP-kezelésnek kedvező hatása van az embrió túlélésére, mivel megvédeheti az embriót a kriokonzerválás/vitrifikálás káros hatásaitól. Ezt a hipotézist több tanulmány is alátámasztja, amelyek szerint a PACAP jelentős antiapoptotikus hatással rendelkezik, valamint védelmet nyújt az oxidatív stressz és a toxinok ellen (Lee et al., 1999; Morelli et al., 2008).

A vitrifikáció megváltoztathatja vagy módosíthatja a génexpressziót/transzkripciók aktivitást. Megfigyelték, hogy a vitrifikáció növeli az apoptotikus gének expressziós szintjét. Majidi Gharenaz és munkatársai (2016) szignifikánsan magasabb Bax pro-apoptotikus és szignifikánsan alacsonyabb Bcl-2 anti-apoptotikus génexpressziót találtak a kétszer vitrifikált embriókban a friss embriókhoz képest. Ugyanakkor nem figyeltek meg szignifikáns különbséget a kétszer vitrifikált és az egyszer vitrifikált csoportok között. Ezek az eredmények összefüggésbe hozhatók a korábban említett vizsgálat tapasztalataival, amelyben szoros kapcsolatot találtak a csökkent fejlődési képesség és a Bax és Bcl-2 gének megváltozott transzkripciók aktivitása között a vitrifikált embriókban (Dhali et al., 2007). Továbbá Majidi Gharenaz és munkatársai (2016) az ErbB4 gén expressziójának szignifikánsan alacsonyabb szintjét figyelték meg a kétszer vitrifikált embriókban a friss embriókhoz képest, és hasonló szinteket találtak az egyszer vitrifikált embriókban, mint a kétszer vitrifikált embriókban. Az ErbB4 és a HB-EGF közötti interakció biztosítja a blasztociszta kapcsolódását az endometriumhoz (Paria et al., 1993; Lim et al., 2006; Davidson & Coward, 2016). A HB-EGF által az embrió felé történő jelátvitel viszont aktiválja a trofoblasztok differenciálódási programját, amely a későbbi kötődés és invázió során az adhézión funkciókhoz szükséges (Lim et al., 2006; Davidson & Coward, 2016). Majidi Gharenaz és munkatársainak (2016) ErbB4 kapcsán tapasztalataikkal szemben, vizsgálatunkban a 2  $\mu$ M PACAP sejtvédő anyagként való használatával a *Hbegf* magasabb relatív expressziós szintjét figyeltük meg. Gazor és munkatársai (2018) a kriokonzerválás negatív hatását találták az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) génexpressziójára. Ezt Riesco és Robles (2013) is megerősítette. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a génexpresszió megváltozhat a vitrifikációs és felolvasztási eljárás során. Magyarázatuk szerint a kriokonzerválás befolyásolja az mRNS-ek stabilitását, ezért azok egy része hajlamos a lebomlásra. Vizsgálataik alapján egyes mRNS-ek szabályozása transzlációs gátlással jár. Szintén megfigyelték egyes transzkriptek csökkenését, sőt, akár eliminációját a kriokonzerválás eredményeként, amelyről García-Herrero és munkatársai (2011) számoltak be. Tekintettel arra, hogy a vitrifikáció során 2  $\mu$ M PACAP-pal kezelt embriókban magasabb *Hbegf* expressziós szintet találtunk, arra utal, hogy az exogén PACAP megvédeheti az embriót a kriokonzerválás korábban említett károsító

hatásától. Shaw és munkatársai (Shaw et al., 2012) a génexpressziót vizsgálták friss és fagyasztott - felolvasztott humán preimplantációs embriókban. Szignifikánsan alacsonyabb génexpressziós szintet találtak a felolvasztás után. Hasonlóan, mi is szignifikánsan alacsonyabb *Hbegf* expressziós szintet tapasztaltunk a TM 1 és TM 2 csoportokban. Adataink arra utalnak, hogy ha a fagyasztás - felolvasztás után a táptalaj PACAP kiegészítését alkalmazzuk, a PACAP már nem képes kifejteni a védőhatást a vitrifikációt követően. További vizsgálatok szükségesek a jelenség magyarázatának megtalálására.

Beszámoltak arról, hogy az implantációra megfelelő blasztociszta által kifejezett HB-EGF parakrin módon indukálja a *Hbegf* expresszióját a méh endometriumban (Hamatani et al., 2004). A szintetizált HB-EGF javítja az embrió fejlődését a kibújt blasztociszta stádiumig, elősegíti a trophoblasztok növekedését és szabályozza annak aktivitását az implantáció során (Lim et al., 2006). Továbbá a HB-EGF indukálja a *Ptgs2*, a prosztaglandin-endoperoxid-szintáz génjének méhbeli expresszióját. Lim és munkatársai (Lim et al., 1997) hibás beágyazódást és decidualizációt találtak *Ptgs2* KO egerekben. Ez arra utal, hogy a beültetés esélye előre jelezhető e gén expressziós szintjéből. A magasabb HB-EGF szintet magasabb implantációs rátával hozták összefüggésbe (Lim et al., 2006). Vizsgálataink alapján a PACAP-kezelt embriókban magasabb expressziós szintet találtunk a friss embriókhoz képest, ami arra utal, hogy a vitrifikációs protokoll alatti PACAP-kezelés dóziszfüggő módon kedvezően hat a *Hbegf* gén expressziójára, ezáltal az implantáció valószínűségére.

Az ivarsejtek kriokonzerválása egyre nagyobb figyelmet kap a biológusok, a klinikusok és az állattartók körében. Humán területen a termékenység megőrzése, illetve egyes értékes állatok esetében a specifikus genotípusok elterjedésének kiszélesítése, illetve veszélyeztetett fajták vagy fajok esetében a biológiai sokféleség megőrzése céljából. Függetlenül a fagyasztási rendszertől, a fagyasztott spermában bizonyos kriosérülések elkerülhetetlenül előfordulnak, különösen a jégkristályok kialakulása miatt a sejteken belül és kívül. A kriokonzerválás legnyilvánvalóbb hatása a spermiumok motilitásának csökkenése (Parks, 1997). Ezt vizsgálataink során is megfigyeltük. Szignifikánsan alacsonyabb motilitást tapasztaltunk a kontroll és az alacsony, 2  $\mu$ M PACAP-pal inkubált spermiumok esetében a friss, natív mintákhoz képest. Ez feltehetőleg a membránpermeabilitás növekedésének eredménye, ami számos molekula, köztük a motilitáshoz szükséges ATP extracelluláris diffúziójához vezet, amelyet a spermiumok a hidegsokk után már nem képesek előállítani (Parks, 1997). A megnövekedett permeabilitás a spermiumok membránjait a fagyasztás során érő jelentős károsodásokhoz kapcsolódik, részben a foszfolipid kettősréteg elrendeződését befolyásoló hőmérséklet-csökkenés, részben pedig a növekvő jégkristályok fizikai hatása miatt. A nagyobb dózisu, 4  $\mu$ M illetve 8  $\mu$ M PACAP sejtvédőként való használata esetében

ugyanakkor a motilitás a friss mintákhoz hasonló volt, nem találtunk szignifikáns eltérést. Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP dózisfüggő módon képes megvédeni a spermiumokat a kriosérülésekkel szemben, ezzel növelve termékenyítő képességüket.

## 12 Új tudományos eredmények

- PACAP KO egerek vizsgálatával, objektív módon, szteroidhormonok-metabolit szintjének (ösztadiol és progeszteron) mérésével igazoltuk, hogy a PACAP nincs hatással a nőstény egerek ösztrozsciklusára.
- Az endogén PACAP-nak citoprotektív szerepe van a preimplantációs embriófejlődés során a DNS fragmentációval szemben, pozitív hatással van a preimplantációs embrió minőségére, hiányában a mikronukleuszok aránya nő.
- Kísérleteink voltak az első próbálkozások preimplantációs embriók PACAP (*Adcyap1*) expressziójának mérésére és először mutattunk ki kapcsolatot méhszöveti PACAP és egy beágyazódásra ható növekedési faktori, a HB-EGF között, ezáltal kimutattuk, hogy a PACAP szerepet játszhat a periimplantációs időszakban a beágyazódás támogatásában. Ezen kívül serkentő hatással van a preimplantációs embriók fejlődésére. Valamint méhszöveti expressziója korai vemhesség esetén embrió jelenlététől függ, nem korlátozódik a progeszteron stimuláló hatására.
- Kutatásunk eredményei voltak az első bizonyítékok, hogy az exogén PACAP preimplantációs embrió tenyésztése során való alkalmazása javítja az embriók minőségét, csökkenti a DNS fragmentációt.
- Vizsgálataink során alkalmaztuk először a PACAP-ot embriók vitrifikációja illetve spermiumok mélyhűtése során. Mind embrió, mind spermium esetében dóziszfüggő módon növeli a krioprezerváció utáni túlélést.

### 13 Irodalom

- AbdelHafez, F., Xu, J., Goldberg, J., & Desai, N. (2011). Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: Assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. *BMC Biotechnology*, *11*, 29. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-29>
- Ahn, H. J., Sohn, I. P., Kwon, H. C., Jo, D. H., Park, Y. D., & Min, C. K. (2002). Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, *61*(4), 466–476. <https://doi.org/10.1002/mrd.10040>
- Albert, M., & Peters, A. H. F. M. (2009). Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Current Opinion in Genetics & Development*, *19*(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.03.004>
- Al-Qudah, M., Alkahtani, R., Akbarali, H. I., Murthy, K. S., & Grider, J. R. (2015). Stimulation of synthesis and release of brain-derived neurotropic factor from intestinal smooth muscle cells by substance P and pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *Neurogastroenterology and Motility*, *27*(8), 1162–1174. <https://doi.org/10.1111/nmo.12604>
- Apa, R., Lanzone, A., Mastrandrea, M., Miceli, F., de Feo, D., Caruso, A., & Mancuso, S. (1997). Control of human luteal steroidogenesis: Role of growth hormone-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, and pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *Fertility and Sterility*, *68*(6), 1097–1102. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)00370-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)00370-1)
- Arata, S., Nakamachi, T., Onimaru, H., Hashimoto, H., & Shioda, S. (2013). Impaired response to hypoxia in the respiratory center is a major cause of neonatal death of the PACAP-knockout mouse. *European Journal of Neuroscience*, *37*(3), 407–416. <https://doi.org/10.1111/ejn.12054>
- Arimura, A. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): Discovery and current status of research. *Regulatory Peptides*, *37*(3), 285–303. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(92\)90621-Z](https://doi.org/10.1016/0167-0115(92)90621-Z)
- Arimura, A., & Shioda, S. (1995). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: Neuroendocrine and endocrine interaction. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *16*(1), 53–88. <https://doi.org/10.1006/frne.1995.1003>

- Arimura, A., Somogyvári-Vigh, A., Miyata, A., Mizuno, K., Coy, D. H., & Kitada, C. (1991). Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*, *129*(5), 2787–2789. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2787>
- Arms, L., & Vizzard, M. A. (2011). Neuropeptides in Lower Urinary Tract (LUT) Function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *202*, 395–423. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16499-6\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16499-6_19)
- Azuma, Y.-T., Hagi, K., Shintani, N., Kuwamura, M., Nakajima, H., Hashimoto, H., Baba, A., & Takeuchi, T. (2008). PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *Journal of Cellular Physiology*, *216*(1), 111–119. <https://doi.org/10.1002/jcp.21381>
- Balaban, B., & Gardner, D. K. (2013). Morphological Assessment of Blastocyst Stage Embryos: Types of Grading Systems and Their Reported Outcomes. In D. K. Gardner, D. Sakkas, E. Seli, & D. Wells (Eds.), *Human Gametes and Preimplantation Embryos: Assessment and Diagnosis* (pp. 31–43). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6651-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6651-2_4)
- Balaban, B., Urman, B., Sertac, A., Alatas, C., Aksoy, S., & Mercan, R. (2000). Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertility and Sterility*, *74*(2), 282–287. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)00645-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)00645-2)
- Balaban, B., Yakin, K., & Urman, B. (2006). Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertility and Sterility*, *85*(3), 559–563. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.11.013>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bilezikjian, L. M., & Vale, W. W. (1983). Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology*, *113*(5), 1726–1731. <https://doi.org/10.1210/endo-113-5-1726>

- Bischof, P., & Campana, A. (2000). Molecular mediators of implantation. *Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14(5), 801–814.  
<https://doi.org/10.1053/beog.2000.0120>
- Bódis, J., Koppán, M., Kornya, L., Tinneberg, H. R., & Török, A. (2001). Influence of melatonin on basal and gonadotropin-stimulated progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells and in the superfused granulosa cell system. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 52(3), 198–202.  
<https://doi.org/10.1159/000052973>
- Borgeat, P., Labrie, F., Côté, J., Ruel, F., Schally, A. V., Coy, D. H., Coy, E. J., & Yanaihara, N. (1974). Parallel stimulation of cyclic AMP accumulation and LH and FSH release by analogs of LH-RH in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1(1), 7–20.  
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(74\)90035-5](https://doi.org/10.1016/0303-7207(74)90035-5)
- Boronkai, A., Brubel, R., Racz, B., Tamas, A., Kiss, P., Horvath, G., Lubics, A., Szigeti, A., Bellyei, S., Toth, G., Lakatos, A., & Reglodi, D. (2009). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03630.x>
- Borzsei, R., Mark, L., Tamas, A., Bagoly, T., Bay, C., Csanaky, K., Banki, E., Kiss, P., Vaczy, A., Horvath, G., Nemeth, J., Szauer, E., Helyes, Z., & Reglodi, D. (2009). Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *European Journal of Endocrinology*, 160(4), 561–565. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0911>
- Bowers, C. Y. (1971). The role of cyclic AMP in the release of anterior pituitary hormones. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 185, 263–290.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1971.tb45254.x>
- Bradley, M. P., & Garbers, D. L. (1983). The stimulation of bovine caudal epididymal sperm forward motility by bovine cumulus-egg complexes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115(3), 777–787.  
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(83\)80002-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(83)80002-3)
- Brandenburg, C. A., May, V., & Braas, K. M. (1997). Identification of Endogenous Sympathetic Neuron Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP): Depolarization Regulates Production and Secretion through Induction of Multiple



Propeptide Transcripts. *The Journal of Neuroscience*, 17(11), 4045–4055.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-11-04045.1997>

- Brubel, R., Boronkai, A., Reglodi, D., Racz, B., Nemeth, J., Kiss, P., Lubics, A., Toth, G., Horvath, G., Varga, T., Szogyi, D., Fonagy, E., Farkas, J., Barakonyi, A., Bellyei, S., Szereday, L., Koppan, M., & Tamas, A. (2010). Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 42(3), 450–458. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9374-5>
- Brubel, R., Kiss, P., Vincze, A., Varga, A., Varnagy, A., Bodis, J., Mark, L., Jambor, E., Maasz, G., Hashimoto, H., Helyes, Zs., Toth, G., Tamas, A., Koppan, M., & Reglodi, D. (2012). Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide on Human Sperm Motility. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(3), 623–630.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-012-9806-5>
- Campard, PK., Crochemore, C., René, F., Monnier, D., Koch, B., & Loeffler, J. P. (1997). PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA and Cell Biology*, 16(3), 323–333.  
<https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.323>
- Campbell, R. M., & Scanes, C. G. (1992). Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regulation*, 2(4), 175–191.
- Cardell, L. O., Uddman, R., Luts, A., & Sundler, F. (1991). Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in guinea-pig lung: Distribution and dilatory effects. *Regulatory Peptides*, 36(3), 379–390. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(91\)90071-N](https://doi.org/10.1016/0167-0115(91)90071-N)
- Cavallaro, S., Copani, A., D'Agata, V., Musco, S., Petralia, S., Ventra, C., Stivala, F., Travali, S., & Canonico, P. L. (1996). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Molecular Pharmacology*, 50(1), 60–66.
- Cecchele, A., Cermisoni, G. C., Giacomini, E., Pinna, M., & Vigano, P. (2022). Cellular and Molecular Nature of Fragmentation of Human Embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1349. <https://doi.org/10.3390/ijms23031349>
- Cecconi, S., Rossi, G., Barberi, M., Scaldaferrri, L., & Canipari, R. (2004). Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on

- Mouse Preantral Follicle Development in Vitro. *Endocrinology*, 145(4), 2071–2079.  
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1004>
- Chartrel, N., Tonon, M. C., Vaudry, H., & Conlon, J. M. (1991). Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology*, 129(6), 3367–3371.  
<https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3367>
- Chian, R. C., Ao, A., Clarke, H. J., Tulandi, T., & Tan, S. L. (1999). Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertility and Sterility*, 71(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00416-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00416-6)
- Chibaa, T., Tanaka, K., Tatsuoka, H., Dun, S. L., & Dun, N. J. (1996). The synaptic structure of PACAP immunoreactive axons in the intermediolateral nucleus of the rat. *Neuroscience Letters*, 214(1), 65–68. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12882-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12882-2)
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Mouradian, R. (1983). Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology*, 20(3), 346–356. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(83\)90023-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90023-8)
- Csanaky, K., Banki, E., Szabadfi, K., Reglodi, D., Tarcai, I., Czeglédi, L., Helyes, Z., Ertl, T., Gyarmati, J., Szanto, Z., Zapf, I., Sipos, E., Shioda, S., & Tamas, A. (2012). Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 48(3), 631–637. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9779-4>
- Csernus, V. (1982). Antibodies of high affinity and specificity for radioimmunological determination of progesterone, testosterone, estradiol-17 $\beta$  and cortisol. *Advances in Steroid Analysis I. Akadémia Kiadó, Budapest*, 171–177.
- Culler, M. D., Kenjo, T., Obara, N., & Arimura, A. (1984). Stimulation of pituitary cAMP accumulation by human pancreatic GH-releasing factor-(1-44). *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1984.247.5.E609>
- Culler, M. D., & Paschall, C. S. (1991). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potentiates the gonadotropin-releasing activity of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*, 129(4). <https://doi.org/10.1210/endo-129-4-2260>

- Cummings, K. J., Pendlebury, J. D., Sherwood, N. M., & Wilson, R. J. A. (2004). Sudden neonatal death in PACAP-deficient mice is associated with reduced respiratory chemoresponse and susceptibility to apnoea. *The Journal of Physiology*, 555(Pt 1), 15–26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.052514>
- Cummings, K. J., Willie, C., & Wilson, R. J. A. (2008). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide maintains neonatal breathing but not metabolism during mild reductions in ambient temperature. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(3), R956-965. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00637.2007>
- Darszon, A., López-Martínez, P., Acevedo, J. J., Hernández-Cruz, A., & Treviño, C. L. (2006). T-type Ca<sup>2+</sup> channels in sperm function. *Cell Calcium*, 40(2), 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.028>
- Davidson, L. M., & Coward, K. (2016). Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 108(1), 19–32. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21122>
- de Groat, W. C., & Yoshimura, N. (2010). Changes in afferent activity after spinal cord injury. *Neurourology and Urodynamics*, 29(1), 63–76. <https://doi.org/10.1002/nau.20761>
- Dennerly, P. A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 81(3), 155–162. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20098>
- 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>
- Dhali, A., Anchamparuthy, V. M., Butler, S. P., Pearson, R. E., Mullarky, I. K., & Gwazdauskas, F. C. (2007). Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification. *Theriogenology*, 68(9), 1292–1298. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.030>
- Dickson, L., & Finlayson, K. (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(3), 294–316. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.006>

- Dokras, A., Sargent, I. L., & Barlow, D. H. (1993). Human blastocyst grading: An indicator of developmental potential? *Human Reproduction (Oxford, England)*, *8*(12), 2119–2127. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137993>
- Duc-Goiran, P., Mignot, T. M., Bourgeois, C., & Ferré, F. (1999). Embryo-maternal interactions at the implantation site: A delicate equilibrium. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, *83*(1), 85–100. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(98\)00310-8](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(98)00310-8)
- Dunson, D. B., Colombo, B., & Baird, D. D. (2002). Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Human Reproduction*, *17*(5), 1399–1403. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1399>
- Duranthon, V., Watson, A., & Lonergan, P. (2008). Preimplantation embryo programming: Transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction (Cambridge, England)*, *135*(2). <https://doi.org/10.1530/REP-07-0324>
- Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Pölz, W., & Tews, G. (2001). Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*, *76*(2), 281–285. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)01904-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01904-5)
- Eckert, J. J., & Fleming, T. P. (2008). Tight junction biogenesis during early development. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1778*(3), 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.031>
- El-Gehani, F., Tena-Sempere, M., & Huhtaniemi, I. (2000). Evidence that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, *63*(5), 1482–1489. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1482>
- El-Gehani, F., Zhang, F. P., Pakarinen, P., Rannikko, A., & Huhtaniemi, I. (1998). Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biology of Reproduction*, *58*(1), 116–123. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.1.116>
- Estudillo, E., Jiménez, A., Bustamante-Nieves, P. E., Palacios-Reyes, C., Velasco, I., & López-Ornelas, A. (2021). Cryopreservation of Gametes and Embryos and Their Molecular Changes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms221910864>

- Fahrenkrug, J., Hannibal, J., Tams, J., & Georg, B. (2000). Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: Relation to PACAP and VIP containing nerves. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(8), 1205–1214. <https://doi.org/10.1097/00004647-200008000-00006>
- Fahy, G. M., Wowk, B., Wu, J., & Paynter, S. (2004). Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, 48(1), 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.11.004>
- Farnham, M. M. J., & Pilowsky, P. M. (2010). The role of PACAP in central cardiorespiratory regulation. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 174(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.05.004>
- Fehér, G. (1987). *Fejlődéstan* (p. 28). A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft.
- Fetterolf, P. M., Jurisicova, A., Tyson, J. E., & Casper, R. F. (1994). Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biology of Reproduction*, 51(2), 184–192. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.2.184>
- Fowler, A., & Toner, M. (2006). Cryo-Injury and Biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066(1), 119–135. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>
- Fridolf, T., Sundler, F., & Ahrén, B. (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): Occurrence in rodent pancreas and effects on insulin and glucagon secretion in the mouse. *Cell and Tissue Research*, 269(2), 275–279. <https://doi.org/10.1007/BF00319618>
- Fujimiya, M., & Inui, A. (2000). Peptidergic regulation of gastrointestinal motility in rodents. *Peptides*, 21(10), 1565–1582. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00313-2](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00313-2)
- Fujimori, T. (2010). Preimplantation development of mouse: A view from cellular behavior. *Development, Growth & Differentiation*, 52(3), 253–262. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01172.x>
- Fülöp V., Lakatos K., Demeter J., Végh G., & Pállinger É. (2022). A decidualizáció klinikai vonatkozásai. *Orvosi Hetilap*, 163(46), 1823–1833. <https://doi.org/10.1556/650.2022.32626>

- García-Herrero, S., Garrido, N., Martínez-Conejero, J. A., Remohí, J., Pellicer, A., & Meseguer, M. (2011). Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*, 22(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.09.013>
- Gazor, R., Eskandari, M., Sharafshah, A., Bahadori, M. H., Golmohammadi, M. G., & Keshavarz, P. (2018). Assessment of EGFR Gene Expression Following Vitrification of 2-cell and Blastocyst Mouse Embryos. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(2), 120–122.
- Ghatei, M. A., Takahashi, K., Suzuki, Y., Gardiner, J., Jones, P. M., & Bloom, S. R. (1993). Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *The Journal of Endocrinology*, 136(1), 159–166. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1360159>
- Gillardon, F., Hata, R., & Hossmann, K. A. (1998). Delayed up-regulation of Zac1 and PACAP type I receptor after transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 61(1–2), 207–210. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00202-2](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00202-2)
- Gonzalez, B. J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., & Vaudry, H. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience*, 78(2), 419–430. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00617-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00617-3)
- Gonzalez, B. J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., & Vaudry, H. (1998). [Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide]. *Annales d'endocrinologie*, 59(5), 364–405.
- Gräs, S., Hannibal, J., & Fahrenkrug, J. (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an auto/paracrine stimulator of acute progesterone accumulation and subsequent luteinization in cultured periovulatory granulosa/lutein cells. *Endocrinology*, 140(5), 2199–2205. <https://doi.org/10.1210/endo.140.5.6737>
- Gräs, S., Hannibal, J., Georg, B., & Fahrenkrug, J. (1996). Transient periovulatory expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide in rat ovarian cells. *Endocrinology*, 137(11), 4779–4785. <https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895347>
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Anastasía, A., & Giojalas, L. C. (2008). Progesterone from the Cumulus Cells Is the Sperm Chemoattractant Secreted by the

- Rabbit Oocyte Cumulus Complex. *PLoS ONE*, 3(8), e3040.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003040>
- Guillemin, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N., & Wehrenberg, W. B. (1982). Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4572), 585–587.  
<https://doi.org/10.1126/science.6812220>
- Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A., & Taylor, H. S. (2009). The Role of Growth Factors and Cytokines during Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1), 62–79. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1108011>
- Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M. G., Ko, M. S. H., & Dey, S. K. (2004). Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), 10326–10331.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402597101>
- Hannibal, J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 453(4), 389–417. <https://doi.org/10.1002/cne.10418>
- Hannibal, J., & Fahrenkrug, J. (1995). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene by rat spermatogenic cells. *Regulatory Peptides*, 55(1), 111–115. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)00110-j](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)00110-j)
- Hannibal, J., Mikkelsen, J. D., Clausen, H., Holst, J. J., Wulff, B. S., & Fahrenkrug, J. (1995). Gene expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regulatory Peptides*, 55(2), 133–148. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)00099-j](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)00099-j)
- Hardy, K., Handyside, A. H., & Winston, R. M. (1989). The human blastocyst: Cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development (Cambridge, England)*, 107(3), 597–604. <https://doi.org/10.1242/dev.107.3.597>
- Hart, G. R., Gowing, H., & Burrin, J. M. (1992). Effects of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, on pituitary hormone release in rats. *The Journal of Endocrinology*, 134(1), 33–41.  
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1340033>

- Hauser-Kronberger, C., Hacker, G. W., Albegger, K., Muss, W. H., Sundler, F., Arimura, A., & Dietze, O. (1996). Distribution of two VIP-related peptides, helospectin and pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), in the human upper respiratory system. *Regulatory Peptides*, *65*(3), 203–209. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(96\)00100-0](https://doi.org/10.1016/0167-0115(96)00100-0)
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, P., & MacGregor, J. T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *18*(4), 277–291. <https://doi.org/10.1002/em.2850180414>
- Heppner, T. J., Hennig, G. W., Nelson, M. T., May, V., & Vizzard, M. A. (2019). PACAP38-mediated bladder afferent nerve activity hyperexcitability and Ca<sup>2+</sup> activity in urothelial cells from mice. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, *68*(3), 348–356. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1119-x>
- Hnida, C., Engenheiro, E., & Ziebe, S. (2004). Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *19*(2), 288–293. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh070>
- Hong, X., Huang, L., & Song, Y. (2008). Role of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the vaginal wall of women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction*, *19*(8), 1151–1157. <https://doi.org/10.1007/s00192-008-0585-z>
- Horvath, G., Illés, A., Heimesaat, M., Bardosi, A., Bardosi, S., Tamas, A., Fulop, B., Opper, B., Németh, J., Ferencz, A., & Reglodi, D. (2016). *Protective Intestinal Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide* (Vol. 11, pp. 271–288). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_17)
- Hoyle, C. H. (1998). Neuropeptide families: Evolutionary perspectives. *Regulatory Peptides*, *73*(1), 1–33. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(97\)01073-2](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(97)01073-2)
- Huang, M., Shirahase, H., & Rorstad, O. P. (1993). Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP. *Peptides*, *14*(4), 755–762. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(93\)90109-T](https://doi.org/10.1016/0196-9781(93)90109-T)



- Isaac, E. R., & Sherwood, N. M. (2008). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 280(1–2), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.09.003>
- Isobe, N., Nakao, T., Yamashiro, H., & Shimada, M. (2005). Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle. *Animal Reproduction Science*, 87(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.08.006>
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2007). Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nature Protocols*, 2(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.145>
- Jackson, K. V., Ginsburg, E. S., Hornstein, M. D., Rein, M. S., & Clarke, R. N. (1998a). Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 70(1), 60–66. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00100-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00100-9)
- Jackson, K. V., Ginsburg, E. S., Hornstein, M. D., Rein, M. S., & Clarke, R. N. (1998b). Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 70(1), 60–66. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00100-9)
- Jaiswal, B. S., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., & Eisenbach, M. (1999). Human sperm chemotaxis: Is progesterone a chemoattractant? *Biology of Reproduction*, 60(6), 1314–1319. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1314>
- Jaworski, D. M., & Proctor, M. D. (2000). Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC(1) receptor mRNA expression in the rat central nervous system. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 120(1), 27–39. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(99\)00192-3](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00192-3)
- Johnson, M. H., Maro, B., & Takeichi, M. (1986). The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 93, 239–255.
- Johnson, M. H., & Ziomek, C. A. (1981). Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: Specificity, geometry, and stability. *The Journal of Cell Biology*, 91(1), 303–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.1.303>

- Kamei, Y., Tsutsumi, O., Kuwabara, Y., & Taketani, Y. (1993). Intrauterine growth retardation and fetal losses are caused by epidermal growth factor deficiency in mice. *The American Journal of Physiology*, 264(3 Pt 2), R597-600.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.264.3.R597>
- Karpiesiuk, A., & Palus, K. (2021). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in Physiological and Pathological Processes within the Gastrointestinal Tract: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), Article 16.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22168682>
- Kashimura, J., Shimosegawa, T., Kikuchi, Y., Koizumi, M., & Toyota, T. (1991). The stimulatory effect of PACAP 38 on amylase release in dispersed rat pancreatic acini. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 164(4), 309–318.  
<https://doi.org/10.1620/tjem.164.309>
- Kawai, K., Ohse, C., Watanabe, Y., Suzuki, S., Yamashita, K., & Ohashi, S. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates insulin release from the isolated perfused rat pancreas. *Life Sciences*, 50(4), 257–261. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90332-J](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90332-J)
- Kayisli, U. A., Guzeloglu-Kayisli, O., & Arici, A. (2004). Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034, 50–63.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1335.005>
- Kivipelto, L., Absood, A., Arimura, A., Sundler, F., Håkanson, R., & Panula, P. (1992). The distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity is distinct from helodermin- and helospectin-like immunoreactivities in the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 5(1), 85–94. [https://doi.org/10.1016/0891-0618\(92\)90036-p](https://doi.org/10.1016/0891-0618(92)90036-p)
- Koh, P. O., Won, C. K., Noh, H. S., Cho, G. J., & Choi, W. S. (2005). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor mRNAs in human placenta. *Journal of Veterinary Science*, 6(1).  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15785117/>
- Kondo, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., & Iijima, T. (1997). Differential alteration of hippocampal synaptic strength induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38). *Neuroscience Letters*, 221(2–3), 189–192.  
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(96\)13323-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(96)13323-1)

- Kononen, J., Paavola, M., Penttilä, T. L., Parvinen, M., & Pelto-Huikko, M. (1994). Stage-specific expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mRNA in the rat seminiferous tubules. *Endocrinology*, *135*(5), 2291–2294. <https://doi.org/10.1210/endo.135.5.7956953>
- Koppan, M., Varnagy, A., Reglodi, D., Brubel, R., Nemeth, J., Tamas, A., Mark, L., & Bodis, J. (2012). Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *48*(3), 617–622. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9743-3>
- Köves, K., Arimura, A., Görcs, T. G., & Somogyvári-Vigh, A. (1991). Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology*, *54*(2), 159–169. <https://doi.org/10.1159/000125864>
- Köves, K., Arimura, A., Somogyvári-Vigh, A., Vigh, S., & Miller, J. (1990). Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology*, *127*(1), 264–271. <https://doi.org/10.1210/endo-127-1-264>
- Köves, K., Arimura, A., Vigh, S., Somogyvári-Vigh, A., & Miller, J. (1993). Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. *Peptides*, *14*(3), 449–455. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(93\)90131-y](https://doi.org/10.1016/0196-9781(93)90131-y)
- Kozicz, T., Vigh, S., & Arimura, A. (1997). Axon terminals containing PACAP- and VIP-immunoreactivity form synapses with CRF-immunoreactive neurons in the dorsolateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Research*, *767*(1), 109–119. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00737-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00737-3)
- Labrie, F., Veilleux, R., Lefevre, G., Coy, D. H., Sueiras-Diaz, J., & Schally, A. V. (1982). Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs. *Science (New York, N.Y.)*, *216*(4549), 1007–1008. <https://doi.org/10.1126/science.6281886>
- Lee, J., Park, H. J., Choi, H. S., Kwon, H. B., Arimura, A., Lee, B. J., Choi, W. S., & Chun, S. Y. (1999). Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of

- PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology*, 140(2), 818–826.  
<https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6485>
- Lessey, B. A., Gui, Y., Apparao, K. B. C., Young, S. L., & Mulholland, J. (2002). Regulated expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in the human endometrium: A potential paracrine role during implantation. *Molecular Reproduction and Development*, 62(4), 446–455. <https://doi.org/10.1002/mrd.10129>
- Leung, P. S., Wong, T. P., Wong, P. Y., & Chan, H. C. (1998). Localization and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat epididymis. *Cell Biology International*, 22(3), 193–198. <https://doi.org/10.1006/cbir.1998.0239>
- Li, M., Nakayama, K., Shuto, Y., Somogyvari-Vigh, A., & Arimura, A. (1998). Testis-specific prohormone convertase PC4 processes the precursor of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Peptides*, 19(2), 259–268.  
[https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(97\)00293-3](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(97)00293-3)
- Li, R. H., & Zhuang, L. Z. (1997). The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 12(4), 830–834. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.4.830>
- Lim, H., Das, S. K., & Dey, S. K. (1998). erbB genes in the mouse uterus: Cell-specific signaling by epidermal growth factor (EGF) family of growth factors during implantation. *Developmental Biology*, 204(1), 97–110.  
<https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9072>
- Lim, H. J., & Dey, S. K. (2009). HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Experimental Cell Research*, 315(4), 619–626.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.07.025>
- Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., & Dey, S. K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 91(2), 197–208. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80402-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80402-x)
- Lim, J. J., Lee, D. R., Song, H.-S., Kim, K.-S., Yoon, T. K., Gye, M. C., & Kim, M. K. (2006). Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) may improve embryonic development and implantation by increasing vitronectin receptor (integrin  $\alpha\beta 3$ ) expression in peri-implantation mouse embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 23(3), 111–119. <https://doi.org/10.1007/s10815-006-9021-9>

- Luconi, M., Francavilla, F., Porazzi, I., Macerola, B., Forti, G., & Baldi, E. (2004). Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*, *69*(8–9), 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2004.05.013>
- Luvoni, G. C., & Colombo, M. (2020). Cold case: Small animal gametes cryobanking. *Theriogenology*, *150*, 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.047>
- Majidi Gharenaz, N., Movahedin, M., Mazaheri, Z., & Pour beiranvand, S. (2016). Alternation of apoptotic and implanting genes expression of mouse embryos after re-vitrification. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, *14*(8), 511–518.
- Makrigiannakis, A., & Minas, V. (2007). Mechanisms of implantation. *Reproductive Biomedicine Online*, *14*(1), 102–109. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60771-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60771-7)
- Makrigiannakis, A., Vrekoussis, T., Zoumakis, E., Kalantaridou, S. N., & Jeschke, U. (2017). The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), 1305. <https://doi.org/10.3390/ijms18061305>
- Marikawa, Y., & Alarcón, V. B. (2009). Establishment of trophoctoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Molecular Reproduction and Development*, *76*(11), 1019–1032. <https://doi.org/10.1002/mrd.21057>
- Masuo, Y., Suzuki, N., Matsumoto, H., Tokito, F., Matsumoto, Y., Tsuda, M., & Fujino, M. (1993). Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Research*, *602*(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90241-e](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90241-e)
- Masuo, Y., Tokito, F., Matsumoto, Y., Shimamoto, N., & Fujino, M. (1994). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its binding sites in the rat brain. *Neuroscience Letters*, *170*(1), 43–46. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90234-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90234-8)
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. *The Journal of Reproduction and Development*, *58*(1), 44–50. <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>

- Matsuda, K., Yoshida, T., Nagano, Y., Kashimoto, K., Yatohgo, T., Shimomura, H., Shioda, S., Arimura, A., & Uchiyama, M. (1998). Purification and primary structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) from the brain of an elasmobranch, stingray, *Dasyatis akajei*. *Peptides*, *19*(9), 1489–1495. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(98\)00091-6](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(98)00091-6)
- Matsumoto, S., Arakawa, Y., Ohishi, M., Yanaihara, H., Iwanaga, T., & Kurokawa, N. (2008). Suppressive action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on proliferation of immature mouse Leydig cell line TM3 cells. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, *29*(6), 321–330. <https://doi.org/10.2220/biomedres.29.321>
- May, V., & Vizzard, M. A. (2010). Bladder dysfunction and altered somatic sensitivity in PACAP-/- mice. *The Journal of Urology*, *183*(2), 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.09.077>
- Mayerhofer, A., Dissen, G. A., Costa, M. E., & Ojeda, S. R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, *138*(8), 3320–3329. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5335>
- McGann, L. E. (1978). Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, *15*(4), 382–390. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(78\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(78)90056-1)
- McRory, J. E., Parker, D. B., Ngamvongchon, S., & Sherwood, N. M. (1995). Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *108*(1–2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)03467-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)03467-8)
- McRory, J. E., Parker, R. L., & Sherwood, N. M. (1997). Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA and Cell Biology*, *16*(1), 95–102. <https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.95>
- Menkveld, R., Wong, W. Y., Lombard, C. J., Wetzels, A. M., Thomas, C. M., Merkus, H. M., & Steegers-Theunissen, R. P. (2001). Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: An effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *16*(6), 1165–1171. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.6.1165>

- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M. D., & Coy, D. H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *164*(1), 567–574. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91757-9)
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., & Arimura, A. (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *170*(2), 643–648. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)92140-u](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)92140-u)
- Miyata, A., Sato, K., Hino, J., Tamakawa, H., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1998). Rat aortic smooth-muscle cell proliferation is bidirectionally regulated in a cell cycle-dependent manner via PACAP/VIP type 2 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *865*, 73–81. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11165.x>
- Morelli, M. B., Barberi, M., Gambardella, A., Borini, A., Cecconi, S., Coticchio, G., & Canipari, R. (2008). Characterization, Expression, and Functional Activity of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors in Human Granulosa-Luteal Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *93*(12), 4924–4932. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2621>
- Moriwaki, T., Suganuma, N., Hayakawa, M., Hibi, H., Katsumata, Y., Oguchi, H., & Furuhashi, M. (2004). Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *19*(1), 152–156. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh003>
- Nakamura, K., Nakamachi, T., Endo, K., Ito, K., Machida, T., Oka, T., Hori, M., Ishizaka, K., & Shioda, S. (2014). Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the human testis and in testicular germ cell tumors. *Andrologia*, *46*(5), 465–471. <https://doi.org/10.1111/and.12102>
- Nemetz, N., Abad, C., Lawson, G., Nobuta, H., Chhith, S., Duong, L., Tse, G., Braun, J., & Waschek, J. A. (2008). Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *122*(8), 1803–1809. <https://doi.org/10.1002/ijc.23308>
- Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C., & Pera, R. A. R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development (Cambridge, England)*, *139*(5), 829–841. <https://doi.org/10.1242/dev.060426>

- Norwitz, E. R., Schust, D. J., & Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, *345*(19), 1400–1408.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra000763>
- Ogi, K., Kimura, C., Onda, H., Arimura, A., & Fujino, M. (1990). Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *173*(3), 1271–1279. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80924-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80924-6)
- Ohkubo, S., Kimura, C., Ogi, K., Okazaki, K., Hosoya, M., Onda, H., Miyata, A., Arimura, A., & Fujino, M. (1992). Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA and Cell Biology*, *11*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1089/dna.1992.11.21>
- Ojala, J., Tooke, K., Hsiang, H., Girard, B. M., May, V., & Vizzard, M. A. (2019). PACAP/PAC1 Expression and Function in Micturition Pathways. *Journal of Molecular Neuroscience*, *68*(3), 357–367. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1170-7>
- Okazaki, K., Itoh, Y., Ogi, K., Ohkubo, S., & Onda, H. (1995). Characterization of murine PACAP mRNA. *Peptides*, *16*(7), 1295–1299. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(95\)02018-r](https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)02018-r)
- Oride, A., Kanasaki, H., Mijiddorj, T., Sukhbaatar, U., Yamada, T., & Kyo, S. (2016). Expression and Regulation of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in Rat Placental Cells. *Reproductive Sciences*, *23*(8), 1080–1086.  
<https://doi.org/10.1177/1933719116630421>
- Ortmann, O., Asmus, W., Diedrich, K., Schulz, K. D., & Emons, G. (1999). Interactions of ovarian steroids with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and GnRH in anterior pituitary cells. *European Journal of Endocrinology*, *140*(3), 207–214.  
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1400207>
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D., & Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *160*(2), 828–833. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)92508-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)92508-4)
- Paria, B. C., Das, S. K., Andrews, G. K., & Dey, S. K. (1993). Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(1), 55–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.55>



- Park, J.-Y., Park, J.-H., Park, H.-J., Lee, J.-Y., Lee, Y.-I., Lee, K., & Chun, S.-Y. (2001). Stage-Dependent Regulation of Ovarian Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide mRNA Levels by GnRH in Cultured Rat Granulosa Cells. *Endocrinology*, *142*(9), 3828–3835. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8384>
- Parker, D. B., Coe, I. R., Dixon, G. H., & Sherwood, N. M. (1993). Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *European Journal of Biochemistry*, *215*(2), 439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18051.x>
- Parker, D. B., Power, M. E., Swanson, P., Rivier, J., & Sherwood, N. M. (1997). Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology*, *138*(1), 414–423. <https://doi.org/10.1210/endo.138.1.4830>
- Parks, J. E. (1997). - Hypothermia and Mammalian Gametes. In A. M. Karow & J. K. Critser (Eds.), *Reproductive Tissue Banking* (pp. 229–261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012399770-8/50006-X>
- Piekorz, R. P., Gingras, S., Hoffmeyer, A., Ihle, J. N., & Weinstein, Y. (2005). Regulation of Progesterone Levels during Pregnancy and Parturition by Signal Transducer and Activator of Transcription 5 and 20 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Molecular Endocrinology*, *19*(2), 431–440. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0302>
- Piggins, H. D., Stamp, J. A., Burns, J., Rusak, B., & Semba, K. (1996). Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *376*(2), 278–294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961209\)376:2<278::AID-CNE9>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961209)376:2<278::AID-CNE9>3.0.CO;2-0)
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., Team, R. C., & others. (2014). *Nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-118*.
- Pinheiro, J. C., & Bates, D. M. (2000). *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer.
- Pohl, M., & Wank, S. A. (1998). Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and glucagon-like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(16), 9778–9784. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9778>

- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of Clinical Investigation*, *114*(6), 744–754. <https://doi.org/10.1172/JCI22991>
- Reglődi, D., Cseh, S., Somoskői, B., Fülöp, B. D., Szentléleky, E., Szegeczki, V., Kovacs, A., Varga, A., Kiss, P., Hashimoto, H., Tamas, A., Bardosi, A., Manavalan, S., Bako, E., Zakany, R., & Juhasz, T. (2018a). Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, *155*(2), 129–139. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0470>
- Reglődi, D., Gyarmati, J., Ertl, T., Borzsei, R., Bodis, J., Tamas, A., Kiss, P., Csanaky, K., Banki, E., Bay, C., Nemeth, J., & Helyes, Z. (2010). Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *Journal of Endocrinological Investigation*, *33*(7), 443–445. <https://doi.org/10.1007/BF03346621>
- Reglődi, D., Illes, A., Opper, B., Schafer, E., Tamas, A., & Horvath, G. (2018b). Presence and Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Under Physiological and Pathological Conditions in the Stomach. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 90. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00090>
- Reglődi, D., Kiss, P., Horvath, G., Lubics, A., Laszlo, E., Tamas, A., Racz, B., & Szakaly, P. (2012a). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropeptides*, *46*(2), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.05.001>
- Reglődi, D., Kiss, P., Szabadfi, K., Atlasz, T., Gabriel, R., Horvath, G., Szakaly, P., Sandor, B., Lubics, A., Laszlo, E., Farkas, J., Matkovits, A., Brubel, R., Hashimoto, H., Ferencz, A., Vincze, A., Helyes, Z., Welke, L., Lakatos, A., & Tamas, A. (11/2012a). PACAP is an Endogenous Protective Factor—Insights from PACAP-Deficient Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, *48*(3), 482–492. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9762-0>
- Reglődi, D., Tamas, A., Koppan, M., Szogyi, D., & Welke, L. (2012c). Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level – Recent Advances. *Frontiers in Endocrinology*, *3*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2012.00155>

- Riesco, M. F., & Robles, V. (2013). Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges. *PLOS ONE*, *8*(6), e67614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067614>
- Roldan, E. R., Murase, T., & Shi, Q. X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science (New York, N.Y.)*, *266*(5190), 1578–1581. <https://doi.org/10.1126/science.7985030>
- Rossato, M., Nogara, A., Gottardello, F., Bordon, P., & Foresta, C. (1997). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates rat Leydig cell steroidogenesis through a novel transduction pathway. *Endocrinology*, *138*(8), 3228–3235. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5314>
- Rosselin, G., Maletti, M., Besson, J., & Rostène, W. (1982). A new neuroregulator: The vasoactive intestinal peptide or VIP. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *27*(3), 243–262. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(82\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(82)90092-2)
- Rytel, L., Wojtkiewicz, J., Snarska, A., & Mikołajczyk, A. (2021). Changes in the Neurochemical Characterization of Enteric Neurons in the Porcine Duodenum After Administration of Low-Dose Salmonella Enteritidis Lipopolysaccharides. *Journal of Molecular Neuroscience*, *71*(8), 1556–1566. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01473-y>
- Sayasith, K., Brown, K. A., & Sirois, J. (2007). Gonadotropin-dependent regulation of bovine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in ovarian follicles prior to ovulation. *Reproduction (Cambridge, England)*, *133*(2), 441–453. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0188>
- Scaldaferri, M. L., Arora, K., Lee, S. H., Catt, K. J., & Moretti, C. (1996). Expression of PACAP and its type-I receptor isoforms in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *117*(2), 227–232. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03752-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03752-7)
- Scaldaferri, M. L., Modesti, A., Palumbo, C., Ulisse, S., Fabbri, A., Piccione, E., Frajese, G., & Moretti, C. (2000). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) and PACAP-Receptor Type 1 Expression in Rat and Human Placenta\*. *Endocrinology*, *141*(3), 1158–1167. <https://doi.org/10.1210/endo.141.3.7346>
- Schwarzenberger, F. (2007). The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*, *41*(1), 52–74. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00017.x>

- Segre, G. V., & Goldring, S. R. (1993). Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 4(10), 309–314. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(93\)90071-I](https://doi.org/10.1016/1043-2760(93)90071-I)
- Seshagiri, P. B., Mishra, A., Ramesh, G., & Rao, R. P. (2002). Regulation of peri-attachment embryo development in the golden hamster: Role of growth factors. *Journal of Reproductive Immunology*, 53(1–2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00086-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00086-9)
- Shaw, L., Sneddon, S. F., Brison, D. R., & Kimber, S. J. (2012). Comparison of gene expression in fresh and frozen–thawed human preimplantation embryos. *Reproduction*, 144(5), 569–582. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0047>
- Sherwood, N. M., Adams, B. A., Isaac, E. R., Wu, S., & Fradinger, E. A. (2007). Knocked down and out: PACAP in development, reproduction and feeding. *Peptides*, 28(9), 1680–1687. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.008>
- Sherwood, N. M., Krueckl, S. L., & McRory, J. E. (2000). The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily\*. *Endocrine Reviews*, 21(6), 619–670. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0414>
- Shigyo, M., Aizawa, H., Inoue, H., Matsumoto, K., Takata, S., & Hara, N. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating peptide regulates neurally mediated airway responses. *The European Respiratory Journal*, 12(1), 64–70. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.12010064>
- Shintani, N., Mori, W., Hashimoto, H., Imai, M., Tanaka, K., Tomimoto, S., Hirose, M., Kawaguchi, C., & Baba, A. (2002). Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regulatory Peptides*, 109(1–3), 45–48. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00169-6](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00169-6)
- Shioda, S., Legradi, G., Leung, W. C., Nakajo, S., Nakaya, K., & Arimura, A. (1994). Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology*, 135(3), 818–825. <https://doi.org/10.1210/endo.135.3.8070375>

- Shivers, B. D., Görcs, T. J., Gottschall, P. E., & Arimura, A. (1991). Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology*, *128*(6), 3055–3065. <https://doi.org/10.1210/endo-128-6-3055>
- Shuto, Y., Uchida, D., Onda, H., & Arimura, A. (1996). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor mRNA in the mouse brain. *Regulatory Peptides*, *67*(2), 79–83. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(96\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(96)00116-4)
- Simón, C., Caballero-Campo, P., García-Velasco, J. A., & Pellicer, A. (1998). Potential implications of chemokines in reproductive function: An attractive idea. *Journal of Reproductive Immunology*, *38*(2), 169–193. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(98\)00031-x](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(98)00031-x)
- Simón, C., Martín, J. C., & Pellicer, A. (2000). Paracrine regulators of implantation. *Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *14*(5), 815–826. <https://doi.org/10.1053/beog.2000.0121>
- Skoglösa, Y., Patrone, C., & Lindholm, D. (1999). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is expressed by developing rat Purkinje cells and decreases the number of cerebellar gamma-amino butyric acid positive neurons in culture. *Neuroscience Letters*, *265*(3), 207–210. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00250-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00250-5)
- Somogyvári-Vigh, A., & Reglodi, D. (2004). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: A potential neuroprotective peptide. *Current Pharmaceutical Design*, *10*(23), 2861–2889. <https://doi.org/10.2174/1381612043383548>
- Somosköi, B., Kovács, M., & Cseh, S. (2016). T-2 mycotoxin slows down the development of mouse blastocysts, decreases their blastomere number and increases chromatin damage. *Acta Veterinaria Hungarica*, *64*(3), 390–400. <https://doi.org/10.1556/004.2016.037>
- Sozen, B., Can, A., & Demir, N. (2014). Cell fate regulation during preimplantation development: A view of adhesion-linked molecular interactions. *Developmental Biology*, *395*(1), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.08.028>
- Spencer, F., Chi, L., & Zhu, M. (2001). Temporal relationships among uterine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, decidual prolactin-related protein and progesterone receptor mRNAs expressions during decidualization and gestation in

- rats. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 129(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(01\)00177-6](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00177-6)
- Spengler, D., Villalba, M., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Houssami, S., Bockaert, J., & Journot, L. (1997). Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *The EMBO Journal*, 16(10), 2814–2825. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2814>
- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P. H., & Journot, L. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*, 365(6442), 170–175. <https://doi.org/10.1038/365170a0>
- Steenstrup, B. R., Alm, P., Hannibal, J., Jorgensen, J. C., Palle, C., Junge, J., Christensen, H. B., Ottesen, B., & Fahrenkrug, J. (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: Occurrence and relaxant effect in female genital tract. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 269(1), E108–E117. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.1.E108>
- Steenstrup, B. R., Jørgensen, J. C., Alm, P., Hannibal, J., Junge, J., Fahrenkrug, J., & Ottesen, B. (1996). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): Occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regulatory Peptides*, 61(3), 197–204. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00156-5)
- Stone, B. A., Greene, J., Vargyas, J. M., Ringler, G. E., & Marrs, R. P. (2005). Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development in vitro and pregnancy outcomes following embryo transfer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(6), 2014–2019; discussion 2019–2020. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.048>
- Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., & von Wolff, M. (2006). The human endometrium as a fertility-determining factor. *Human Reproduction Update*, 12(5), 617–630. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml033>
- Sulila, P., Lundkvist, U., & Mattsson, R. (1988). Effects of pseudopregnancy on immunoglobulin-secreting cells in mice. *Journal of Reproductive Immunology*, 13(2), 175–182. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(88\)90060-5](https://doi.org/10.1016/0165-0378(88)90060-5)
- Sundler, F., Ekblad, E., Absood, A., Håkanson, R., Köves, K., & Arimura, A. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating peptide: A novel vasoactive intestinal peptide-like neuropeptide in the gut. *Neuroscience*, 46(2), 439–454. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90064-9)

- Takahashi, M. (2012). Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *The Journal of Reproduction and Development*, *58*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1262/jrd.11-138n>
- Takahashi, M., Keicho, K., Takahashi, H., Ogawa, H., Schultz, R. M., & Okano, A. (2000). Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*, *54*(1), 137–145. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00332-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00332-0)
- Tanii, I., Aradate, T., Matsuda, K., Komiya, A., & Fuse, H. (2011). PACAP-mediated sperm–cumulus cell interaction promotes fertilization. *REPRODUCTION*, *141*(2), 163–171. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0201>
- Tatsuno, I., & Arimura, A. (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mobilizes intracellular free calcium in cultured rat type-2, but not type-1, astrocytes. *Brain Research*, *662*(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90790-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90790-0)
- Tatsuno, I., Somogyvari-Vigh, A., & Arimura, A. (1994). Developmental changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat brain. *Peptides*, *15*(1), 55–60. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90170-8](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90170-8)
- Tazuke, S. I., & Giudice, L. C. (1996). Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal: Embryonic interactions. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, *14*(3), 231–245. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1016333>
- Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W., & Giojalas, L. C. (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertility and Sterility*, *86*(3), 745–749. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.080>
- Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Uñates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Morales Garcia, A. A., & Giojalas, L. C. (2009). Molecular Mechanism for Human Sperm Chemotaxis Mediated by Progesterone. *PLoS ONE*, *4*(12), e8211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008211>
- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., & Harris, R. C. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype. *Science (New York, N.Y.)*, *269*(5221), 230–234. <https://doi.org/10.1126/science.7618084>

- Toth, D., Szabo, E., Tamas, A., Juhasz, T., Horvath, G., Fabian, E., Opper, B., Szabo, D., Maugeri, G., D'Amico, A. G., D'Agata, V., Vicena, V., & Reglodi, D. (2020). Protective Effects of PACAP in Peripheral Organs. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00377>
- Tsuji, T., Ishizaka, K., & Winters, S. J. (1994). Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on gonadotropin secretion and subunit messenger ribonucleic acids in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology*, 135(3), 826–833. <https://doi.org/10.1210/endo.135.3.7915230>
- Tsuji, T., & Winters, S. J. (1995). Effects of pulsatile pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on gonadotropin secretion and subunit mRNA levels in perfused rat pituitary cells. *Life Sciences*, 56(13), 1103–1111. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00047-a](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00047-a)
- Tsutsumi, O., & Oka, T. (1987). Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 156(1), 241–244. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(87\)90245-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(87)90245-6)
- Uddman, R., Luts, A., Arimura, A., & Sundler, F. (1991). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a new vasoactive intestinal peptide (VIP)-like peptide in the respiratory tract. *Cell and Tissue Research*, 265(1), 197–201. <https://doi.org/10.1007/BF00318155>
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., & Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science (New York, N. Y.)*, 213(4514), 1394–1397. <https://doi.org/10.1126/science.6267699>
- Valojerdi, M. R., Eftekhari-Yazdi, P., Karimian, L., Hassani, F., & Movaghar, B. (2009). Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(6), 347. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9318-6>
- Vanderhyden, B. C., & Tonary, A. M. (1995). Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1243–1250. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1243>



- Várnagy Á. (2012). *In vitro* fertilizáció kimenetelét és lehetséges szövődményeit meghatározó faktorok vizsgálata [Doktori értekezés, ETK Egészségtudományi Doktori Iskola]. <http://pea.lib.pte.hu/handle/pea/16252>
- Vaudry, D., Basille, M., Anouar, Y., Fournier, A., Vaudry, H., & Gonzalez, B. J. (1998). The neurotrophic activity of PACAP on rat cerebellar granule cells is associated with activation of the protein kinase A pathway and c-fos gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 865, 92–99. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11167.x>
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B. K. C., Hashimoto, H., Galas, L., & Vaudry, H. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological Reviews*, 61(3), 283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., & Vaudry, H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From structure to functions. *Pharmacological Reviews*, 52(2), 269–324.
- Vigh, S., Arimura, A., Köves, K., Somogyvári-Vigh, A., Sitton, J., & Fermin, C. D. (1991). Immunohistochemical localization of the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), in human and primate hypothalamus. *Peptides*, 12(2), 313–318. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(91\)90018-k](https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90018-k)
- Vizzard, M. A. (2006). Neurochemical plasticity and the role of neurotrophic factors in bladder reflex pathways after spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 152, 97–115. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(05\)52007-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)52007-7)
- Vladimirov, I. K., Tacheva, D., Dobrinov, V., Vladimirov, I. K., Tacheva, D., & Dobrinov, V. (2018). The Present and Future of Embryo Cryopreservation. In *Embryology—Theory and Practice*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80587>
- Wang, J., Mayernik, L., Schultz, J. F., & Armant, D. R. (2000). Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development (Cambridge, England)*, 127(1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.127.1.33>
- Waschek, J. A., Casillas, R. A., Nguyen, T. B., DiCicco-Bloom, E. M., Carpenter, E. M., & Rodriguez, W. I. (1998). Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-

activating peptide (PACAP) and receptor: Potential role in patterning and neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9602–9607.

- Watanabe, J., Nakamachi, T., Matsuno, R., Hayashi, D., Nakamura, M., Kikuyama, S., Nakajo, S., & Shioda, S. (2007). Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides*, 28(9), 1713–1719. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.06.029>
- Westphal, L. M., el Dansasouri, I., Shimizu, S., Tadir, Y., & Berns, M. W. (1993). Exposure of human spermatozoa to the cumulus oophorus results in increased relative force as measured by a 760 nm laser optical trap. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 8(7), 1083–1086. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138197>
- Whitman, M., & Melton, D. A. (1989). Growth factors in early embryogenesis. *Annual Review of Cell Biology*, 5, 93–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.05.110189.000521>
- Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., O'Connor, J. F., Baird, D. D., Schlatterer, J. P., Canfield, R. E., Armstrong, E. G., & Nisula, B. C. (1988). Incidence of early loss of pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 319(4), 189–194. <https://doi.org/10.1056/NEJM198807283190401>
- Winters, S. J., & Moore, J. P. (2020). PACAP: A regulator of mammalian reproductive function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110912. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110912>
- Wong, A. O., Leung, M. Y., Shea, W. L., Tse, L. Y., Chang, J. P., & Chow, B. K. (1998). Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: Immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinology*, 139(8), 3465–3479. <https://doi.org/10.1210/endo.139.8.6145>
- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed.* (pp. 67–70). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
- Wu, M. J., Kee, K. H., Na, J., Kim, S. W., Bae, Y., Shin, D. H., Choi, S., Jun, J. Y., Jeong, H.-S., & Park, J.-S. (2015). Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide Inhibits Pacemaker Activity of Colonic Interstitial Cells of Cajal. *The Korean Journal of*

*Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 19(5), 435–440.

<https://doi.org/10.4196/kjpp.2015.19.5.435>

Wu, S. Y., & Dun, N. J. (1997). Potentiation of NMDA currents by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in neonatal rat sympathetic preganglionic neurons. *Journal of Neurophysiology*, 78(2), 1175–1179. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.2.1175>

Xu, Z., Ohtaki, H., Watanabe, J., Miyamoto, K., Murai, N., Sasaki, S., Matsumoto, M., Hashimoto, H., Hiraizumi, Y., Numazawa, S., & Shioda, S. (2016). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. *Scientific Reports*, 6, 22373. <https://doi.org/10.1038/srep22373>

Yada, T., Sakurada, M., Ihida, K., Nakata, M., Murata, F., Arimura, A., & Kikuchi, M. (1994). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is an extraordinarily potent intra-pancreatic regulator of insulin secretion from islet beta-cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(2), 1290–1293.

Yamamoto, K., Hashimoto, H., Hagihara, N., Nishino, A., Fujita, T., Matsuda, T., & Baba, A. (1998). Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene*, 211(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00110-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00110-3)

Yamashita, Y., Shimada, M., Okazaki, T., Maeda, T., & Terada, T. (2003). Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1193–1198. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010934>

Yanaihara, H., Vigh, S., Kozicz, T., Somogyvári-Vigh, A., & Arimura, A. (1998). Immunohistochemical demonstration of the intracellular localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat testis using the stamp preparation. *Regulatory Peptides*, 78(1–3), 83–88. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(98\)00125-6](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(98)00125-6)

Ye, X., Franco, A. A., Santos, H., Nelson, D. M., Kaufman, P. D., & Adams, P. D. (2003). Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Molecular Cell*, 11(2), 341–351. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00037-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00037-6)

- Yon, L., Feuilloy, M., Chartrel, N., Arimura, A., Conlon, J. M., Fournier, A., & Vaudry, H. (1992). Immunohistochemical distribution and biological activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. *The Journal of Comparative Neurology*, *324*(4), 485–489. <https://doi.org/10.1002/cne.903240403>
- Yoshiyama, M., & de Groat, W. C. (2008a). Effects of intrathecal administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on lower urinary tract functions in rats with intact or transected spinal cords. *Experimental Neurology*, *211*(2), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.02.022>
- Yoshiyama, M., & de Groat, W. C. (2008b). The role of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neural pathways controlling the lower urinary tract. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *36*(1–3), 227–240. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9090-6>
- Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(5), 939–980. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.011>
- Zhou, W. L., Leung, P. S., Wong, T. P., Dun, N. J., Wong, P. Y., & Chan, H. C. (1997). Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *The Journal of Endocrinology*, *154*(3), 389–395. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1540389>
- Ziessen, T., Moncada, S., & Cellet, S. (2002). Characterization of the non-nitroergic NANC relaxation responses in the rabbit vaginal wall. *British Journal of Pharmacology*, *135*(2), 546–554. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704481>
- Zvarova, K., Dunleavy, J. D., & Vizzard, M. A. (2005). Changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide expression in urinary bladder pathways after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, *192*(1), 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.017>

## 14 A doktori kutatás eredményeinek közlései

### 14.1 Lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

1. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Bordás Lilla, Reglődi Dóra, Cseh Sándor: **Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide supplementation, applied during or after vitrification on mouse embryo**. Acta Veterinaria Hungarica, (2023);71(2), 112-118. *IF (2022): 0,9*
2. Somoskői Bence, **Török Dóra**, Reglodi Dóra, Tamas Andrea, Fülöp Balázs, Cseh Sándor: **Possible effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on early embryo implantation marker HB-EGF in mouse**. Reproductive Biology. 2020;20. *IF (2020): 2,376*
3. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Reglődi Dóra, Tamás Andrea, Fülöp Balázs, Cseh Sándor: **Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása nőstény egerek ciklusára és az embriófejlődésre - Előzetes eredmények**. Magyar Állatorvosok Lapja, 2018;140(3):181-187. *IF (2018): 0,143*

### 14.2 Konferencia közlemények

1. **Török Dóra**, Bordás Lilla, Müller Linda, Somoskői Bence, Cseh Sándor: **PACAP alkalmazási lehetősége embriók és hímivarsejtek krioprezervációja során állatmodelleken**, 2024. 04. 05-06. XI. Szimpózium – Az IVF múltja és jövője Magyarországon, a Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság és a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika közös szimpóziuma, Keszthely
2. **Török Dóra**, Kispál Dóra, Müller Linda, Bordás Lilla, Cseh Sándor, Somoskői Bence: **A PACAP, mint krioprotektáns alkalmazása kutya mellékhere eredetű spermiumok mélyhűtése során**, 2023. 11. 10-11., 28. Szaporodásbiológiai találkozó, Szarvas
3. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Bordás Lilla, Cseh Sándor, **A PACAP alkalmazási lehetősége embriók vitrifikálása során**, 2023. 02. 24-25., I. Magyar Agrártudományi Doktoranduszok Szimpóziuma, MADOSZ, Debrecen
4. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Bordás Lilla, Reglődi Dóra, Cseh Sándor; **PACAP increases survival rate and *Hbegf* expression of blastocysts when used as an additive during vitrification**, ICAR2022 + 2, 26th-30th June 2022., Bologna (Italy) Abstract Book (2022) p. 26.

5. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Bordás Lilla, Cseh Sándor; **A PACAP mint krioprotektáns használata embriók vitrifikálása során**; 2021. 26. Szaporodásbiológiai találkozó, Balatonkenese
6. **Dóra Török**, Bence Somoskői, Lilla Bordás, Andrea Tamás, Dóra Reglődi, Sándor Cseh, **Application possibilities of PACAP during embryo vitrification**, 2021. nov. 3-5. Meeting of the Society of Low Temperature Biology (SLTB)
7. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Cseh Sándor, **Az exogén PACAP hatása a vitrifikált embriók fejlődésére és beágyazódási képességére**, 2021. Akadémiai beszámolók, Budapest
8. Somoskői B., **Török D.**, Reglődi D., Tamás A., Fülöp B. D., Cseh S., **Effects of pituitary adenylate cyclase activating polipeptide (PACAP) on early embryo development and implantation**, ECAR 2019 Symposium Vetmeduni Vienna, Austria, 2019.07.04-06.
9. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Cseh Sándor; **Beágyazódási faktor vizsgálata egérembriókon**, 2019. Új Nemzeti Kiválóság Program rendezvény, Budapest
10. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Cseh Sándor; **Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatásának vizsgálata a gonadális szervekre és a preimplantációs embriók fejlődésére**, 2018. 24. Szaporodásbiológiai találkozó, Székesfehérvár
11. Bálint Petrányi, **Dóra Török**, Dóra Reglődi, Andrea Tamás, Bence Somoskői, Sándor Cseh, **Effects of endogenous and exogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on early mouse embryo development** Fiala Biotechnológusok Országos Konferenciája, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar 2018. március 28-29.
12. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Cseh Sándor; **Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása az egérembriók fejlődésére**, 2017. Akadémiai beszámolók, Budapest

***TDK konferencia:***

Varga Ilona: Exogén PACAP hatása az embriók minőségére és fagyasztás utáni túlélésére; Állatorvostudományi Egyetem, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék  
Témavezetők: Török Dóra, Dr. Somoskői Bence, Dr. Cseh Sándor 2022.

### 14.3 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

1. **Török D**, Somoskői B, Müller L, Bordás L, Cseh S. **Őshonos magyar kankutyák genetikai anyagának megőrzése: a sperma rövid ideig történő tárolásával kapcsolatos vizsgálatok: Előzetes eredmények.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2021;143(9):563-568. *IF (2021): 0,236*
2. Angyal E, Somoskői B, **Török D**, Bordás L, Cseh S, Novotniné D. G, Vincze B. **Az anti-Müller-hormon (AMH) mennyiségének összefüggése a petefészekképletekkel és a petesejttartalék kimerülésével kancában és tehénben.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2023;145(2):113-127. doi:10.56385/magyallorv.2023.02.113-127 *IF (2021): 0,236*
3. Bordás L, Somoskői B, **Török D**, Vincze B, Cseh S. **Post-thaw viability of mouse preantral follicles after cryopreservation with cryotube freezing and OPS vitrification procedures.** Reproductive Biology. 2023;23(2). doi:10.1016/j.repbio.2023.100752 *IF (2022): 2,1*
4. Somoskői B, Bordás L, Uno F, Kispál D, Müller L, **Török D**, Cseh S. **Effects of different cryopreservation methods on canine isolated preantral follicles.** Animal Reproduction Science, 2023;258, 107361. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107361> *IF (2022): 2,2*
5. Vincze B, Deanna R, Angyal E, Somoskői B, **Török D**, Bordás L, Cseh S. **A ló asszisztált reprodukciója: az *in vitro* fertilizáció kudarca – a petesejt kinyerés és kapcsolódó technikák sikere.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2022;144(8):451-462. *IF (2021): 0,236*
6. Somoskői B, Bordás L, **Török D**, Gupta PSP, Mondal S, Nadni S, Cseh S. **Egér preantrális tüszők izolálása, *in vitro* tenyésztése és mélyhűtése vitrifikációs technikával - előzetes eredmények.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2021;143(4):225-234. *IF (2021): 0,236*

#### **Konferencia közlemények**

1. Bordás Lilla, **Török Dóra**, Kispál Dóra, Müller Linda, Cseh Sándor, Somoskői Bence; **Különböző vitrifikációs módszerek hatása kutya preantrális follikulusokra**, 2024. 04. 05-06. XI. Szimpózium – Az IVF múltja és jövője Magyarországon, a Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság és a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika közös szimpóziума, Keszthely
2. Bacsa Mónika, Bakony Mikolt, **Török Dóra**, Somoskői Bence, Müller Linda, Keresztes Zsuzsanna, Cseh Sándor; **Spermafagyasztó médiumok összehasonlítása**

- kutyasperma minták mélyhűtése során**, 2024. 04. 05-06. XI. Szimpózium – Az IVF múltja és jövője Magyarországon, a Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság és a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika közös szimpóziuma, Keszthely
3. Bordás Lilla, **Török Dóra**, Kispál Dóra, Müller Linda, Cseh Sándor, Somoskői Bence; **Kutya preantrális folliculusok vitrifikációja kétféle módszerrel**, 2023. 11. 10-11., 28. Szaporodásbiológiai találkozó, Szarvas
  4. Bordás Lilla, Uno Fusa, **Török Dóra**, Müller Linda, Cseh Sándor, Somoskői Bence; **Prospects of culture and vitrification of canine and mouse preantral follicles**, 2023. 02. 24-25, I. Magyar Agrártudományi Doktoranduszok Szimpóziuma, MADOSZ, Debrecen
  5. Bacsa Mónika, Bakony Mikolt, **Török Dóra**, Somoskői Bence, Müller Linda, Keresztes Zsuzsanna, Cseh Sándor; **Kutya spermafagyasztó oldatok összehasonlító vizsgálata**, 2023. 02. 24-25, I. Magyar Agrártudományi Doktoranduszok Szimpóziuma, MADOSZ, Debrecen
  6. Somoskői Bence, Egerszegi István, **Török Dóra**, Albert Fruzsina, Nagy Szabolcs, Bodó Szilárd, Debnár Viktória, Benedek Zsuzsanna, Tóth Péter, Rátky József: **Magyar sertésfajták in vitro génmegőrzése**, 2022. 11. 11-12. 27. Szaporodásbiológiai Találkozó, Székesfehérvár
  7. Vincze B, Somoskői B, Cseh S, Bordás L, **Török D**, Zenke P. **Novel primer validation for fetal sex determination from maternal plasma in mares during pregnancy**. In: ICAR 2020+2 Bologna, Italy: 19 th International Congress on Animal Reproduction BOLOGNA (ITALY), 26 th -30 th JUNE 2022: Abstract Book (2022) p. 131 Paper: P 174, 1 p.
  8. L. Bordás, **D. Török**, B. Vincze, L. Müller, S. Cseh, B.Somoskői **Prospects of culture and vitrification of canine and mouse preantral follicles**, ICAR2022 + 2, Bologna (Italy), 26th-30th June 2022. Abstract Book (2022) p. 114
  9. **Török Dóra**, Somoskői Bence, Müller Linda, Cseh Sándor, **Kutya sperma eltarthatósági vizsgálatok különböző hígítókbán, 5 °C-on történő tárolással**, 2021. jún. 10. Új Nemzeti Kiválóság Program rendezvény, Budapest
  10. **Török Dóra**, Müller Linda, Somoskői Bence, Cseh Sándor: **Kutya sperma eltarthatósági vizsgálatok különböző hígítókbán, 5 °C-on történő tárolással**, 2021.01.27., Akadémiai beszámoló, Budapest



11. **Török Dóra**, Müller Linda, Kispál Dóra, Farkas Szilvia, Szilágyi Eszter, Csepreghy Anna, Erdei Krisztián, Somoskői Bence, Christensen Bruce, Végi Barbara, Hudák Péter, Rátky József, Barna Judit, Gáspárdy András, Maróti-Agóts Ákos, Cseh Sándor: **Kutyasperma tárolására és fagyasztására alkalmazott különböző tápoldatok összehasonlító vizsgálata**, 2020.10.06., GÉNNET-21, Online szakmai konferencia

***TDK konferencia:***

Obst Lina: Effects of delivery time and different cryopreservation methods on canine epididymal sperm; Állatorvostudományi Egyetem, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék; Témavezetők: Somoskői Bence, **Török Dóra**, 2023.

Pethő Dorottya Kinga: Kutya sperma minták hűtve tárolásával kapcsolatos vizsgálatok; Állatorvostudományi Egyetem, Szülészeti és Szaporodásbiológiai; Tanszék; Témavezetők: Bacsa Mónika, **Török Dóra**, Cseh Sándor, 2021

## 15 Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Cseh Sándornak és Dr. Somoskői Bencének, akik rengeteget segítettek és irányították tudományos munkámat és fejlődésemet. Végtelenül hálás vagyok nekik, amiért mindig mellettem álltak és támogattak. Köszönettel tartozom munkatársaimnak Bordás Lillának és Keresztes Zsuzsannának, akik nem csak szakmailag, de az élet minden területén támogattak és jelenlétüknek köszönhetően minden nap jó hangulatban telt az Andrológiai Laboratóriumban. Ez több, mint egy kutatócsoport.

Hálásan köszönöm az Andrológiai és Asszisztált Reprodukciós Kutatócsoport minden tagjának a változatos és kihívásokkal teli munkákat, lehetőséget teremtve számomra a folyamatos szakmai fejlődésre.

Köszönettel tartozom Vonáné Nagy Alicenak az Endokrinológiai laboratórium munkatársának, aki nélkül nem tudtam volna elsajátítani a radioimmunoassay módszert, valamint a Szülészeti Klinika munkatársainak, akik a fáradhatatlanul gyűjtötték számomra a mintákat az ivartalanítások során. Továbbá köszönettel tartozom a Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinikának, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a vizsgálatok elvégzésére.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Lang Zsoltnak és Piross Imre Sándornak a statisztikában nyújtott segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai tanszék munkatársainak, Dr. Reglődi Dórának, Dr. Tamás Andreának, Dr. Fülöp Baláznak, hogy biztosították vizsgálataimhoz a CD1 egértörzset és az exogén peptidet.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak, akikre mindig számíthattam, akik támogattak és megteremtették a körülményeket céljaim eléréséhez. Nélkülük nem tarthatnék most itt. Köszönöm Mayának a végtelen türelmét, hogy a hosszú séták és játék helyett éjszakába nyúlóan olvashattam cikkeket vagy elemezhettem az adatokat. Külön köszönet illeti páromat, Bálintot, aki végig támogatott, segített a hétvégi mintagyűjtésekben, átolvasta a cikkeimet és bármikor számíthattam rá.

A kutatás az OTKA 115874 pályázat keretéből valósult meg. A 134887 számú projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a FK\_20 pályázati program finanszírozásában, a TKP2020-NKA-01 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában valósult meg. A kutatást a Budapesti Állatorvostudományi Egyetem Stratégiai Kutatási Alapja támogatta (SRF-001 számú támogatás).