

Effects of hypophysis adenylate cyclase activating polypeptide on female cycle and embryo development in mice – preliminary results

D. Török^{1*}
B. Somoskői¹
D. Reglődi²
A. Tamás²
B. Fülöp²
S. Cseh¹

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Szülészeti és Szaporodásbiológiai
Tanszék és Klinika
H-1078 Budapest, István u. 2.

2. PTE-ÁOK, Anatómiai Intézet
H-7624 Pécs, Szigeti út 12.

*e-mail: torok.dora@student.univet.hu

Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása nőstény egerek ciklusára és az embriófejlődésre – előzetes eredmények

Török Dóra^{1*}, Somoskői Bence¹, Reglődi Dóra², Tamás Andrea², Fülöp Balázs², Cseh Sándor¹

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők jelen tanulmányukban, előzetes eredményeik alapján bemutatják az endogén hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) hatását a nőivarú egerek ciklusára, az embriófejlődésre és -minőségre, PACAP-ot termelő és génkiütött állatokon végzett vizsgálataikkal. A ciklusdiagnosztika során radioimmunoassay technikával, bélsárból határozták meg az ösztradiol- és progeszteron-koncentrációkat. A szerzők blasztomerszámlálást és mikronukleuszarány-meghatározást végeztek az embriók fejlődésének és minőségének meghatározására. A PACAP-génkiütött egyedeknél nagyobb progeszterontendenciát és nagyobb mikronukleusz-arányt tapasztaltak.

SUMMARY

Background: Due to the antiapoptotic effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its widespread presence in the organ system, PACAP is considered as a general cytoprotective peptide. The peptide was found in the gonads in high levels, what drew attention to that the peptide might play a central role in reproduction.

Objectives: The aim of the present study is to assess the effect of the endogenous peptide on embryo development and quality compared with PACAP KO mice. Moreover, the authors examine the role of the PACAP to the production of progesterone and oestradiol (with radioimmunoassay) in females and to the quality of the semen in male mice.

Materials and methods: PACAP-producing (wild type) and KO CD1 mice were examined through the experiments. Zygotes produced by natural mating were obtained from donor superovulated females 5-6 hours after copulation. Embryos were cultured for 96 hours *in vitro* and developmental state, cell number and micronuclei rate were assessed. Faeces were collected for 3 weeks from 10 mice (5 KO and 5 wild type) and oestradiol and progesterone levels were measured with radioimmunoassay.

Results and discussion: Higher blastomere number was found in PACAP KO embryos than in wild ones ($p = 0,0022$). However, the advanced PACAP KO embryos have significantly higher micronucleus rate compared to advanced wild type embryos ($p = 0,01$). Although oestradiol peak levels did not differ significantly, PACAP-KO mice showed higher concentrations as in the case of progesterone. Due to their data, further experiments will be carried out.

ÉLETTAN

A hipofízis adenilátcikláz aktiváló polipeptidet (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide – PACAP) 1989-ben izolálták először juh hipotalamuszból. Nevét arról kapta, hogy a cAMP-szintet emeli a hipofízisben (9). A PACAP egy neuropeptid, aminek az aminosavsorrendje nagymértékű, 84–100% azonos-ságot mutatnak azokban a gerincesekben, amelyekben napjainkig kimutatták (1). A PACAP legfontosabb előfordulási helye az agyvelő és ezen belül a hipotalamusz. A hipotalamuszon kívül az adenohipofízisben is kimutatták a PACAP-ot és a PACAP-receptorokat. Ez arra enged következtetni, hogy a PACAP a hipotalamusz mellett az elülső hipofízislebensz hormonális működésének szabályozásában is részt vesz (21). Ez közelebről azt jelenti, hogy a PACAP több felszabadító hormon és hipofízis eredetű hormon termelésének és elválasztásának az irányításában is közreműködhet (13).

A PACAP egy neuropeptid, amelynek aminosav-sorrendje 84–100%-os azonos-ságot mutat a fajokban, amelyekben leírták

Általános sejtvédő anyagként működik a szervezetben, segíti azok túlélését

Az elmúlt csaknem három évtized kutatásai rávilágítottak arra, hogy a PACAP-fehérje – nagy valószínűséggel – általános sejtvédő anyagként működik a szervezetben (8). Ugyanis a PACAP egyik legfontosabb élettani hatása, hogy segíti a sejt túlélését. Ezt a jelenséget először idegsejtekben figyelték meg. Ennek köszönhetően kezdetben fontos neuroprotektív fehérjeként tartották számon (18, 20). Később számos tanulmányban bizonyították, hogy antiapoptotikus hatása nem csak az idegsejtekénél, hanem más sejtípusoknál is megfigyelhető.

A PACAP központi szerepet játszhat a szaporodásbiológiai folyamatokban is

A központi idegrendszeren kívül a PACAP-nak és receptorának fontos előfordulási helyei még a különböző perifériás szervek, mint pl. a petefészek, tüdőfolyadék, méh, méhlepény, emlőszövet (14, 17, 19) és a hereszövet (2, 16). Az ivarszervekben való jelentős mennyiségű jelenlétük hívta fel a figyelmet arra, hogy a PACAP központi szerepet játszhat a szaporodásbiológiai folyamatokban is. Ezt látszik alátámasztani, hogy a PACAP-génnel nem rendelkező (génkiütött; KO) és PAC1-receptorral nem rendelkező (KO) egerekben egyaránt zavart szenved a reprodukció (csökken a termékenység, esetleg teljes meddőség alakul ki). Azt azonban még ma sem ismerjük közelebről, hogy ez milyen folyamat eredményeképpen következik be (11). Feltételezik, hogy a PACAP a hipofízis eredetű gonadotrop hormonok termelésére és kibocsátására egyaránt hatással van, még pedig az ún. autokrin/parakrin folyamat révén és végeredményképpen így gyakorol befolyást a szaporodási folyamatokra. A szaporodással való kapcsolatát látszik erősíteni, hogy nőstény egerekben kimutatták, hogy a PACAP az ösztrosciklus különböző szakaszaiban eltérő mennyiségben van jelen a hipotalamuszban (11). Ma már olyan adatok is rendelkezésünkre állnak, amelyek arra utalnak, hogy nem csak a gonadotrop hormonok, ha nem a progeszteron és prolaktin hormonok szekréciójára is hatással van (23). Ezzel szemben a PACAP-KO és PAC1-receptorhiányos nőstény egerek ösztrosciklusa, párzási viselkedése, valamint ovulációja és a levált petesejtek száma nem tért el a kontroll egerektől. Ugyanakkor a PACAP-KO és PAC1-receptorhiányos nőstények vemhesülésében – az irodalomban közölt adatok szerint – meglehetősen nagy eltérések lehetnek (13–50%) (5). A nagy különbségek magyarázataként a kísérleti egerek genetikai hátterét, kompenzációs folyamatokat, eltérő mértékben zavart beágyazódást, korai magzatfelszívódást és az engedélyezett párzások számát szokták megemlíteni (több párzási lehetőség esetén kisebb a vemhesült állatok számában tapasztalható csökkenés) (3).

Vizsgálataink célja volt, hogy további adatokat gyűjtsünk azzal kapcsolatban, hogy milyen hatással van a PACAP a nőivarú állatok nemi ciklusára és az ovulációt / termékenyülést követően a korai embriók fejlődésére.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokat PACAP-génkiütött, ill. vad típusú CD1-egértörzs 5–5, 8 hetes egyedén végezték

Az ösztadiol és a progeszteron napi szintjét 21 napig bélsármin-tákból határozták meg

TARTÁSI KÖRÜLMÉNYEK

A vizsgálatokat CD1-egértörzs 8 hetes egyedén végeztük (PACAP-KO $n = 5$, vad típus $n = 5$), amelyet közösen folytatott kutatási program keretében a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Tanszéke biztosított számunkra. Az állatokat az Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika kísérleti állatházában tartottuk 21 °C-on, 65%-os páratartalom és 12 óra sötét/12 óra világos fényprogramon. Az állatok tartási körülményei megfelelnek az aktuális jogszabály feltételeinek (40/2013 [II. 14] Kormányrendelet az állatkísérletekről) (állatvédelmi engedély száma: PE/EA/1101-7/2017).

HORMONVIZSGÁLAT

Az ösztadiol és progeszteron napi szintjeinek méréséhez az egerek minden nap azonos időpontban, 21 napig gyűjtött bélsármintáit használtuk fel. A hormonvizsgálathoz bélsárextaktumot használtunk. Az extrahálás IsoBE és mtsai módosított protokollja alapján történt (6). A progeszteron radioimmunoassay-hez CSERNUS és mtsai módszerét követtük (4). Az intra-assay CV (próbán belüli mérési hibaszázalék) $< 10\%$. Az inter-assay CV (próbák közötti mérési hibaszázalék) kiszámításához 2, az előzetes mérések során használt mintát alkalmaztunk (Kontroll1 és Kontroll2). Inter-assay CV: 9,16 ill. 7,34%. Analitikai érzékenység 0,7365 nmol/l. Az ösztadiol meghatározását bevont csöves RIA KIT-tel végeztük a gyártó protokolljának 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. Analitikai érzékenység 0,25 pg/ml. Az ösztrozsciklus során az ösztadiol koncentrációja ovuláció előtt megemelkedik, felvesz egy csúcspontot, a ciklus további részében alacsonyabb szinten mozog. Ezzel szemben a progeszteron nagy koncentrációban van jelen, csak az ovuláció előtt csökken le, mélypontértéket felvéve. Az adatelemzésnél a kapott koncentrációkat ösztadiol esetén alap- és csúcspontokra, progeszteron esetén pedig plató- és mélypontértékekre osztottuk.

EMBRIÓK KINYERÉSE ÉS IN VITRO TENYÉSZTÉSE

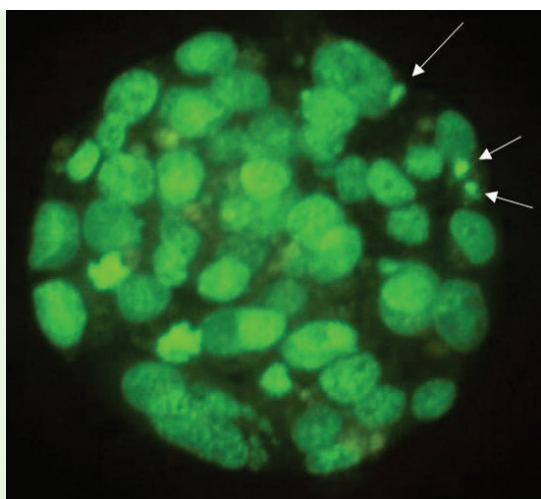
A zigótákat 8 hetes szuperovuláltatott (7,5 NE PMSG, 48 óra elteltével 7,5 NE hCG; Alvetra und Werfft AG; Ausztria) nőstényekből nyertük ki, amelyeket a hCG injekciót követően egyedileg hímekhez helyeztünk 1 éjszakára. A zigótákat a párzást követő reggelen nyertük ki, majd G1 (Vitrolife, Svédország) tápfolyadékban 96 órán keresztül *in vitro* tenyésztettük őket (37,5 °C, 6,5% CO₂, maximális páratartalom). Ezt követően megvizsgáltuk a fejlődési állapotot, blasztociszta arányt, SYBR14 festéssel meghatároztuk a sejtszámot, valamint a fejlődési stádiumnak megfelelő morfológiájú embriókban ellenőriztük a blasztomerek kromatin állományát (1. ábra).

STATISZTIKAI ANALÍZIS

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.

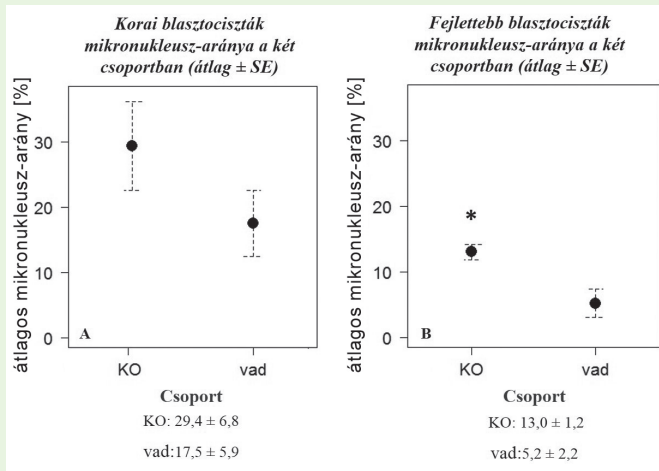
Az ösztadiol alap- és csúcspont, ill. a progeszteron plató és mélypontértékek összehasonlítására általános lineáris kevert modelleket (LME) használtunk, az R NLME könyvtár segítségével (12).

Az eredmények kiértékelésénél 5%-os szignifikanciaszinttel dolgoztunk.



1. ÁBRA. SYBR Greennel megfestett embrió
A nyilak a mikronukleuszokat jelzik

FIGURE 1. Representative image of an embryo stained with SYBR Green
Arrows show micronuclei



2. ÁBRA. Mikronukleuszok aránya korai (A) és expandált (fejlettebb B) fejlettségű blasztocisztákban; (*) $p < 0,05$

FIGURE 2. Micronuclei rate in early (A) and late/expanded (B) blastocysts; (*) $p < 0.05$

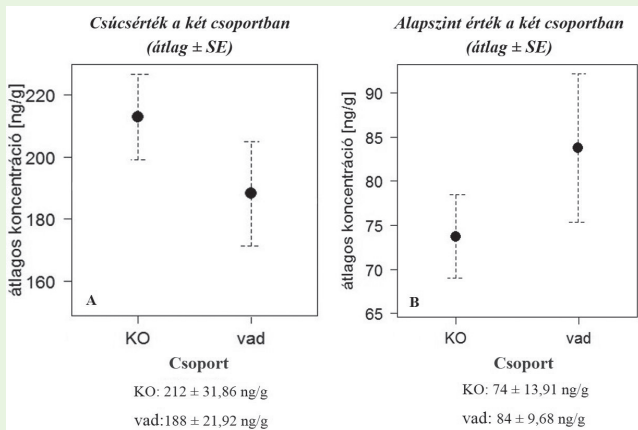
EREDMÉNYEK

EMBRIÓFEJLŐDÉS, EMBRIÓMINŐSÉG

Az embriók vitalitására, fejlődésére, valamint fejlődési erélyére 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: $40,40 \pm 7,4$).

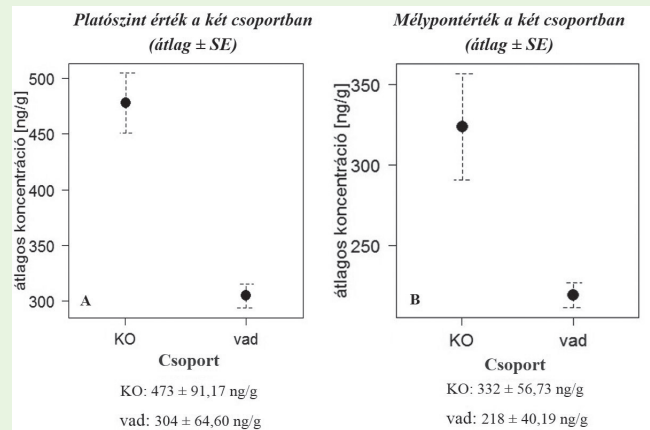
A mikronukleusz-arányokat tekintve, azoknál a blasztocisztáknál, amelyek a 96 órás tenyésztés alatt csak a korai stádiumot érték el, nem volt szignifikáns különbség a két kezelési csoportban ($p = 0,18$) (2A. ábra) és szignifikánsan nagyobb arányban ($p = 0,02$) tartalmaztak mikronukleuszt, mint a fejlettebb blasztociszták (középidős, expandált, kibújt).

A fejlettebb embriók esetében viszont szignifikánsan nagyobb arányban tartalmaztak mikronukleuszt a PACAP-KO embriók ($p = 0,01$) (2B. ábra).



3. ÁBRA. Ösztradiol koncentrációk csúcs (A) –és alapértékei (B) az egyes csoportokban

FIGURE 3. Peak (A) and baseline (B) oestradiol concentrations in each group



4. ÁBRA. Progesteron plató (A) és mélypontértékek (B) az egyes csoportokban

FIGURE 4. Plateau (A) and baseline (B) concentrations of progesterone in each group

HORMONTERMELÉS

A PACAP-KO egereknél három nőstény esetén 3, kettő esetén 4 ciklust tudunk elkülöníteni az ösztradiolcsúcs alapján. A vad típusú nőstényeknél pedig négy egyednél 4, egy egyednél 3 ciklus különítettünk el. Az ovulációt megelőző ösztadiolcsúcsok értékeiben ($p = 0,47$), valamint alapszintjének értékeiben ($p = 0,5$) nem volt szignifikáns különbség a két csoportban (3A., ill. 3B. ábrák).

Vizsgálataink alapján azt is megállapítottuk, hogy a két csoport progesteron platósintjeiben ($p = 0,1$) és mélypontértékeiben ($p = 0,07$) sem volt szignifikáns különbség (4A., ill. 4B. ábrák).

MEGBESZÉLÉS

A PACAP hiánya megzavarja a beágyazódás folyamatát

A PACAP szaporodásbiológiai hatásaival foglalkozó korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a PACAP több szinten is hatással van/lehet a reprodukcióra. A megfigyelések azonban eléggé ellentmondásosak mivel PACAP-KO egerekben az ivarézés, a pázás, az ovuláció és a termékenyülés folyamata zavartalan. Ezzel szemben ISAAC és SHERWOOD csökkent utódszámot figyeltek meg PACAP-KO egerekben, ami azt sugallja, hogy a PACAP fontos szerepet tölthet be a beágyazódásban (5). Az említett szerzők vizsgálatainak az eredményei arra engednek következtetni, hogy a PACAP hiánya megzavarja a beágyazódás folyamatát és ezért nem alakul ki vemhesség. Érdekes megfigyelés, hogy ha egy ciklusnál hosszabb ideig helyezték a nőstényeket a hímek ketrecébe és ezáltal több pázásra nyílt lehetőség a vemhes PACAP-KO egyedek száma emelkedett. Ez a tapasztalat azt jelzi, hogy a PACAP hiányából jelentkező vemhességelmoradás nem mindegyik pázás alkalmával jelentkezik, hanem inkább azt mondhatjuk, hogy PACAP-KO egerek (PACAP-hiány) reprodukciós folyamata zavart és ez a vemhes egyedek számának csökkenéséhez vezethet. Ez a csökkenés azonban bizonyos mértékben kivédhető a pázások számának növelésével. Összességében a beágyazódási zavarokat, a vemhes állatok számának csökkenését a vemhesség kialakulását támogató hormonok (prolaktin, progeszteron) termelésének zavarával/csökkenésével magyarázzák, amelynek hátterében a PACAP hiánya húzódhat meg.

A PACAP-KO és a kontroll csoport egerei egyformán reagáltak a szuperovulációs hormonkezelésre és a termékenyülés folyamata is zavartalan volt

Esetünkben, amikor a szuperovulációs hormonkezelést és pázást követően nyertük az embriókat donor PACAP-KO és ún. vad (PACAP-pal rendelkező, kontroll) egerekből a két csoport között a kinyerhető embriók számában nem találtunk különbséget. Ez arra enged következtetni, hogy a kísérleti (PACAP-KO) és kontroll (vad, PACAP-ot termelő) csoport egerei egyformán reagáltak a szuperovulációs hormonkezelésre és a termékenyülés folyamata is zavartalan volt mindkét csoportban és ennek tudható be, hogy a kinyert embriók számában nem találtunk különbséget. Ugyanakkor ISAAC és SHERWOOD csökkent utódszámot figyeltek meg PACAP-KO egerekben (5). Mivel esetünkben az 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 (implantációs képessége) csökken (5).

Szignifikáns különbségek voltak a blasztomerek sejtszámában a PACAP-KO egerek javára, de a vad típusokéban kevesebb mikronukleusz volt

ZAKHARTCHENKO (24) és SHAPIRO (15) adatai alátámasztják, hogy az embriók sejtszáma (blasztomerek száma) meghatározza a fejlődési képességet. Ezért az embrióban található blasztomerek száma alkalmazható a fejlődő embrió életképességének (a továbbfejlődés esélyének) a jellemzésére. Kisebb blasztomerszám esetében a csökkent fejlődési képességre következtethetünk (15, 24). A blasztomerekben megfigyelt mikronukleuszok számát viszont az kisebb fejlődési eréllyel és beágyazódási képességgel hozták kapcsolatba (7, 10). Kísérleteinkben szignifikáns különbséget találtunk a sejtszámában a PACAP-KO és a PACAP vad típusú egerek között, a PACAP-KO egerek javára. A PACAP vad típusú egerek embrióiban azonban kevesebb mikronukleuszt mutattunk ki. Összefoglalva, a PACAP-KO egerek esetében az embriók blasztomer száma nagyobb volt, de több mikronukleuszt tartalmaztak, mint a vad egerek embriói (igaz, esetükben viszont kisebb volt az átlagos blasztomerszám). Mivel a nagy mikronukleusz-arányt összefüggésbe hozták a gyenge beágyazódási sikerrel (7) és a fejlődési folyamatok akadályozottságával (10), ezért a kisebb mikronukleusz-arányból a vad típusú embriók jobb minőségére következtethetünk. A vad típusú embriókban tapasztalt kisebb mikronukleusz-arány feltételezhetően a PACAP sejtvédő hatásának köszönhető.

A mikronukleuszok kisebb aránya az embriók jobb minőségére utal

Érdekes, hogy bár a korai stádiumú embriók tenyésztése során szabályos fejlődést figyeltünk meg, a 96 órás *in vitro* tenyésztés után, egyik kezelési csoportban

sem találtunk kibújó vagy kibújt blasztocisztát, ami egyéb, reprodukciós vizsgálatokban használt egértörzseknél jellemző (pl.: BDF1 egértörzs). A PACAP-KO egerek esetében megfigyelésünk összhangban van ISAAC és SHERWOOD eredményével és az abból levont következtetéssel, miszerint a PACAP-hiányos egerekben a reprodukciós teljesítmény csökkenését beágyazódási zavarok idézik elő (5). Ha ugyanis a blasztociszta stádiumú embrió nem képes kibújni az öt körülvevő zona pellucidából (tok), akkor természetesen nem kezdődhet el a beágyazódás. A PACAP-pal rendelkező ún. vad egerekből származó embriók esetében jelentkező kibújás képtelenségre egyelőre nem tudjuk a magyarázatot.

Az egérnek, a patkánynak és a szíriai aranyhórcsögnek átlagosan 5 napos ciklusa van, de gyakran szabálytalan (22). Ezt a tapasztalatot saját megfigyeléseink is alátámasztják, hiszen vizsgálataink során különböző ciklushosszt állapítottunk meg az egyedek között. A PACAP-KO nőstényeknél nagyobb progeszteronszintre utaló tendenciát figyeltünk meg, ami hatással lehet a szaporodási folyamatokra, azáltal, hogy gátolja az ovulációt és a párzási viselkedés kialakulását. Ennek ellentmondani látszik, hogy mások normális ovulációs folyamatot és párzási viselkedést tapasztaltak a KO egerekben (5). Összességében elmondható, hogy a két csoport embriószámában nem tapasztaltunk különbséget, ugyanakkor a PACAP-KO embriók nagyobb mikronukleusz-arányából következtetünk, azok rosszabb minőségére. Hormontermelésükre vonatkozó vizsgálataink során nagyobb progeszteronszint-tendenciát figyeltünk meg a PACAP-hiányos (KO) csoportban, amely akadályozhatja az ovulációt és a párzási viselkedést. Előzetes vizsgálataink alátámasztása érdekében és igazolására további vizsgálatokra van még szükség.

A PACAP-KO nőstényeknél nagyobb progeszteron-szintre utaló tendenciát figyeltünk meg, ami hatással lehet a szaporodási folyamatokra

A két csoport embriószámában nem tapasztaltak különbséget, ugyanakkor a PACAP-KO embriók nagyobb mikronukleusz-aránya rosszabb minőségekre utal

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás az OTKA 115874 pályázat keretéből valósult meg. A szerzők köszönetet mondanak PIROSS IMRE SÁNDORNAK a statisztikában nyújtott segítségével.

IRODALOM

- ADAMS, B. A. – LESCHIED, D. W. et al.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in sturgeon, whitefish, grayling, flounder and halibut: cDNA sequence, exon skipping and evolution. *Regulatory Peptides*, 2002. 109. 27–37.
- ARIMURA, A. – SOMOGYVARI-VIGH, A. et al.: Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*, 1991. 129. 2787–2789.
- CANIPARI, R. – DI PAOLO, V. et al.: PACAP in the reproductive system. In: REGLODI, D. – TAMAS, A. (eds.): Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide– PACAP. Current Topics in Neurotoxicity. Switzerland, Springer International Publishing. 2016. Vol. 11.
- CSERNUS, V.: Antibodies of high affinity and specificity for radioimmunological determination of progesterone, testosterone and estradiol-17b. In: GÖRÖG, S. (ed.): Advances in steroid analysis. Budapest, Akadémiai Kiadó. 1982. 171–179.
- ISAAC, E. R. – SHERWOOD, N. M.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2008. 280. 13–19.
- ISOBE, N. – NAKAO, T. et al.: Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005. 87. 1–10.
- JACKSON, K. – GINSBURG, E. et al.: 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. *Fertil. Steril.*, 1998. 70. 60–66.
- LEBON, A. – SEYER, D. et al.: Identification of proteins regulated by PACAP in PC12 cells by 2D gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006. 1070. 380–387.
- MIYATA, A. – ARIMURA, A. et al.: Isolation of a novel residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989. 164. 567–574.
- MORIWAKI, T. – SUGANUMA, N. et al.: Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. *Hum. Reprod.*, 2004. 19. 152–156.
- MOORE, J. P. JR. – BURGER, L. L. et al.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide messenger RNA in the paraventricular nucleus and anterior pituitary during the rat estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 2005. 73. 491–499.
- PINHEIRO, J. C. – BATES, D. M.: Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer. 2000.
- REGLODI, D. – TAMAS, A. – KOPPAN, M. – SZOGYI, D. – WELKE, L.: Role of PACAP in female fertility and reproduction at gonadal level—recent advances. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2012. 3. 155.
- SCALDAFERRI, L. – ARORA, K. et al.: Expression of PACAP and its type-I receptor isoforms in the rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996. 117. 227–232.

15. SHAPIRO, B. – HARRIS, D. – RICHTER, K.: Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil. Steril.*, 2000. 73. 582–586.
16. SHIODA, S. – LEGRADI, G. et al.: 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*, 1994. 135. 818–825.
17. SKAKKEBAEK, M. – HANNIBAL, J. – FAHRENKRUG, J.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat mammary gland. *Cell. Tissue. Res.*, 1999. 298. 153–159.
18. SOMOGYVARI-VIGH, A. – REGLODI, D.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.*, 2004. 10. 2861–2889.
19. VAUDRY, D. – FALLUEL-MOREL, A. et al.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.*, 2009. 61. 283–357.
20. VAUDRY, D. – ROUSSELLE, C. et al.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *PNAS*, 2002. 99. 6398–6403.
21. VIGH, S. – ARIMURA, A. – GOTTSCHALL, P. E. – KITADA, C. – SOMOGYVARI-VIGH, A. – CHILDS, G. V.: Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides*, 1993. 14. 59–65.
22. WANG, H. – DEY, S. K.: Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.*, 2006. 7. 185–199.
23. WINTERS, S. J. – MOORE, J. P.: PACAP, an Autocrine/Paracrine Regulator of Gonadotrophs. *Biol. Reprod.*, 2011. 84. 844–850.
24. ZAKHARTCHENKO, V. – WOLF, E. et al.: Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryo cloning. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995. 42. 53–57.
- Közlésre érkező: 2017. aug. 16.