

**A PACAP és receptorának vizsgálata az anyatejben, különböző
tejalapú készítményekben, az emlő szövetében és
sejttenyészeteiben**

Doktori (PhD)-értekezés

Dr. Csanaky Katalin Andrea

Témavezetők: Dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár
Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens
Programvezető: Dr. Csernus Valér, egyetemi tanár
Doktori iskola vezetője: Dr. Lénárd László, egyetemi tanár



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

Pécs, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	8
1.1.	A pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)	8
1.2.	A PACAP receptorok	8
1.3.	A PACAP előfordulása a szervezetben	9
1.4.	A PACAP élettani hatásai	10
1.4.1.	<i>A PACAP idegrendszeri és néhány további alapvető élettani hatása</i>	10
1.4.2.	<i>A PACAP és a reprodukció</i>	11
1.4.3.	<i>A PACAP általános citoprotektív hatása és szerepe az apoptózis folyamatának befolyásolásában</i>	12
1.4.4.	<i>A PACAP és a sejt differenciálódás</i>	13
1.5.	PACAP a testnedvekben	13
1.6.	Bioaktív anyagok a tejben és tejalapú készítményekben	16
1.6.1.	<i>Az anyatej összetétele és annak változása a szoptatás során</i>	16
1.6.2.	<i>Az anya- és tehéntej, valamint a tehéntej alapú készítmények eltérő összetétele</i>	17
1.6.3.	<i>Neuropeptidok a tejben</i>	17
1.7.	PACAP és PACAP receptorok, valamint egyéb neuropeptidok az emlő szövetében	18
1.8.	Az emlőhámsejtek laktogén differenciálódásának szabályozása	19
1.8.1.	<i>A laktogén differenciálódás hormonális szabályozása</i>	19
1.8.2.	<i>Egyéb faktorok szerepe az emlőhámsejtek differenciálódásában</i>	19
1.8.3.	<i>Neuropeptidok és az emlőhámsejtek differenciálódása</i>	20
1.9.	Célkitűzéseink és vizsgálataink	20
2.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
2.1.	Mintagyűjtés	22
2.1.1.	<i>Anyatej minták gyűjtése</i>	22
2.1.2.	<i>Kereskedelmi forgalomban kapható tej alapú készítmények</i>	22
2.1.3.	<i>Laktáló és nem laktáló juh, valamint normál humán emlő minták</i>	23
2.2.	Sejtkultúrák	23
2.2.1.	<i>HC11 egér emlősejtek</i>	23
2.2.2.	<i>HC11 egér emlősejt differenciáció</i>	23
2.2.3.	<i>Egyéb sejtkultúrák (HMEC, MCF-7 és MDA-MB-468)</i>	24
2.3.	PACAP-RIA	24
2.3.1.	<i>Minta előkészítés</i>	24
2.3.2.	<i>A PACAP38 antitest és a ¹²⁵I-dal jelölt PACAP előállítása</i>	25
2.3.3.	<i>RIA mérés</i>	25

2.4.	Tömegspektrometria	26
2.4.1.	<i>MALDI TOF/TOF.....</i>	26
2.4.2.	<i>Minta előkészítés</i>	26
2.4.3.	<i>Tömegspektrometriás mérés.....</i>	26
2.5.	A PAC1 receptor mikroszkópos vizsgálata	27
2.5.1.	<i>A PAC1 receptor ellenes antitest előállítása.....</i>	27
2.5.2.	<i>Fluoreszcens immunhisztokémia</i>	27
2.5.3.	<i>Fluoreszcens immuncitokémia.....</i>	28
2.6.	Western blot.....	28
2.6.1.	<i>Vizsgálati csoportok</i>	28
2.6.2.	<i>Antitestek</i>	29
2.7.	Egér citokin és angiogenezis array.....	30
2.8.	Statisztikai analízis	30
3.	EREDMÉNYEK.....	31
3.1.	PACAP38-IR anya- és tehéntejben, tejpörökben, valamint tápszerekben	31
3.1.1.	<i>Humán tejminták</i>	31
3.1.2.	<i>Friss tehéntej, pasztörizált tehéntej, tejpör és tápszerminták.....</i>	32
3.2.	PAC1 receptor expresszió.....	34
3.2.1.	<i>Laktáló és nem laktáló emlőminták PAC1 receptor immunhisztokémiája</i>	34
3.2.2.	<i>HC11, HMEC, MCF7 és MDA-MB-468 emlő sejtvonalak PAC1 receptor expressziója</i>	34
3.3.	DIP indukálta differenciálódás vizsgálata HC11 sejtenyészeten	34
3.4.	HC11 sejtek kemo- és citokin, valamint növekedési és angiogenezis faktor szekréciónja DIP és PACAP-hatás alatt	37
3.4.1.	<i>Citokin array vizsgálatok</i>	37
3.4.2.	<i>Angiogenezis array vizsgálatok.....</i>	38
4.	MEGBESZÉLÉS	40
4.1.	A PACAP38-IR változása a szoptatási időszak alatt.....	40
4.1.1.	<i>PACAP38-IR a kolosztrumban</i>	40
4.1.2.	<i>A PACAP38-IR változása a szoptatás 1-17. hónapjában.....</i>	40
4.1.3.	<i>PACAP38-IR az elő- és utótejben.....</i>	40
4.2.	A PACAP a tehéntejben, tejpörökben és tápszerekben.....	41
4.2.1.	<i>A tehéntej összetétele és feldolgozása. PACAP38-IR a tehéntejben.....</i>	41
4.2.2.	<i>Tejpörök és tápszerek gyártási folyamata. PACAP38-IR tejpörökben és tápszerekben</i>	42
4.3.	Az anyatejben jelen levő PACAP eredete.....	43
4.4.	A tejben kimutatott PACAP feltételezhető élettani hatásai.....	44

4.4.1.	<i>A PACAP és az idegrendszer korai fejlődése</i>	45
4.4.2.	<i>A PACAP mint immunmodulátor</i>	46
4.4.3.	<i>A PACAP és a PRL szekréció</i>	47
4.5.	A PAC1 receptor jelenléte az emlőhámsejteken	48
4.5.1.	<i>Immuncitokémiai vizsgálatok sejtenyészeteken</i>	48
4.5.2.	<i>Normál és laktáló emlőből származó minták szövettani vizsgálatai</i>	48
4.5.3.	<i>Daganatos emlősejtek és szövetek VPAC1-2 és PAC1 receptorai</i>	49
4.6.	A HC11-es egér emlősejtek laktogén differenciációja	49
4.6.1.	<i>A HC11 sejtvonal eredete és felhasználása laktogén differenciálódási modellekben (szilimarin, leptin, inzulin, IGF)</i>	49
4.6.2.	<i>PACAP és a HC11 sejtek laktogén differenciálódása</i>	51
4.7.	HC11 sejtek cito- és kemokin, valamint növekedési faktor szekréciója	52
4.7.1.	<i>Inzulinszerű növekedési faktorok és hordozó fehérjék</i>	52
4.7.2.	<i>Interleukinok</i>	52
4.7.3.	<i>Kemokinek</i>	53
4.7.4.	<i>Növekedési faktorok</i>	53
4.8.	A PACAP hatása a differenciálatlan emlősejtek AREG és EGF szekréciójára	55
4.8.1.	<i>Az EGF, AREG és TGFα szekréció szabályozása</i>	55
4.8.2.	<i>EGF és AREG, valamint egyes neuropeptidok és az EGFR aktivációja</i>	56
4.8.3.	<i>Az AREG szerepe az emlőtumorok növekedésében</i>	56
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	58
5.1.	Vizsgálataink tárgya	58
5.2.	Vizsgálataink eredményei	58
5.3.	Eredményeink értékelése	59
6.	IRODALOMJEGYZÉK	61
7.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	84
7.1.	<i>Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények</i>	84
7.2.	<i>Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények</i>	84
7.3.	<i>Az értekezés témájába közvetlenül nem illeszkedő egyéb közlemények</i>	85
7.4.	<i>Idézhető absztraktok</i>	85
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	87
9.	MELLÉKLET	89

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

ACTH: Adrenocorticotropic hormone
ADAM17: a disintegrin and metallopeptidase domain 17
Akt/PKB: Protein Kinase B
AREG: Amphiregulin
Bad: Bcl-2-associated death promoter
Bax: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BSA: Bovine serum albumin
cAMP: Cyclic adenosine monophosphate
cGMP: Cyclic guanosine monophosphate
CCK: Cholecystokinin
CGRP: Calcitonin gene-related peptide
CID: Collision induced decay
CRH: Corticotropin-releasing hormone
DIP: Dexamethasone, Insulin, Prolactin
DPPIV: Dipeptidyl peptidase-IV
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF: Epidermal growth factor
EGFR: EGF-receptor
EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid
ERK: Extracellular-signal-regulated kinase
FBS: Fetal bovine serum
FCS: Fetal calf serum
FGF: Fibroblast growth factor
FSH: Follicle-stimulating hormone
GAS: Interferon-Gamma Activated Sequence
G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor
GH: Growth hormone

GHRH: Growth-hormone-releasing hormone

GIP: Glucose-dependent insulintropic polypeptide

GLP: Glucagon-like peptide

GnRH: Gonadotropin-releasing hormone

GPCR: G protein-coupled receptor

HB-EGF: Heparin binding EGF-like growth factor

hCG: Human chorionic gonadotropin

HEPES: Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid

HER: Human epidermal growth factor receptor 2

HGF: Hepatocyte growth factor

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HPLC: High-performance liquid chromatography

HRP: Horseradish peroxidase

IGF: Insulin-like growth factor

IGFBP: Insulin-like growth factor-binding protein

IL: Interleukin

IL-1ra: Interleukin-1 receptor antagonist

IL-R: Interleukin-receptor

INF: Interferon

IP: Inositol trisphosphate

IP-10: Interferon gamma-induced protein 10

IR: Insulin receptor

JAK: Janus kinase

JNK: c-Jun N-terminal kinases

KO: Knockout

LH: Luteinizing hormone

LHRH: Luteinizing-hormone-releasing hormone

MALDI TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor

MDGI: Mammary-derived growth inhibitor

MET: HGF-receptor

mRNS: „messenger” ribonukleinsav

MTP: Massive target plate

NPY: Neuropeptid Y

p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase

PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

PACAP38-IR: PACAP38-immunreaktivitás

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

PDGF: Platelet-derived growth factor

PHI: Peptide histidine isoleucine

PHM: Peptide histidine methionine

PHV: Peptide histidine valine

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PKA: Protein kinase A

PKC: Protein kinase C

PLP: Parathyroid hormone-like protein

PRL/P: Prolactin

PSD: Post source decay

PTHrP: Parathyroid hormone-related protein

PTHrP: Parathyroid hormone-related protein

qRT-PCR: Real-time polymerase chain reaction

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B

RANKL: Receptor activator NF κ B ligand

RANTES: Regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted

RIA: Radioimmunoassay

RPMI médium: Roswell Park Memorial Institute médium

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

SEM: Standard Error of Mean
SM: Sclerosis multiplex
SOCS: Suppressor of cytokine signaling
SOM: Somatostatin
Src: Rous sarcoma virus
STAT: Signal transducer and activator of transcription
TBS-T: Tris-buffered saline-Tween 20
TFA: Trifluoroacetic acid
TGF: Transforming growth factor
TH: Tyrosine hydroxylase
TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF: Tumor necrosis factor
TRH: Thyrotropin-releasing hormone
UHT: Ultra-high temperature
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VIP: Vasoactive intestinal peptide
WAP: Whey acidic protein
 α -MSH: α -Melanocyte-stimulating hormone

1. BEVEZETÉS

1.1. A pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)

A PACAP egy 38 aminosavból álló C-terminálisán α -amidált peptid, melyet 1989-ben Arimura és munkacsoportja izolált birka hypothalamusból. Nevét hypophysis sejt kultúrán kifejtett adenilát cikláz aktiváló és következményes cyclic adenosine monophosphate (cAMP) emelő hatása révén kapta (Miyata és mtsai 1989).

Szerkezetileg leginkább a vasoactive intestinal peptide (VIP)-hez hasonló, mellyel N-terminális szakasza 68 %-ban megegyezik, azonban adenilát cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb. A glükagon, a glucagon-like peptide (GLP)-1 és 2, a growth-hormone-releasing hormone (GHRH), a VIP, a peptide histidine methionine (PHM), a szekretin és a glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) mellett a szekretin/glükagon/GHRH peptidcsalád tagja (Lee és mtsai 2007). A PACAP biológiailag aktív N-terminális struktúrája az evolúció során rendkívül konzervált, bizonyítva a peptid fontos biológiai szerepét (Bourgault és mtsai 2011). Egy évvel a PACAP38 felfedezése után azonosították rövidebb fragensét, a PACAP27-et. A két peptid N-terminálisa mutat azonosságot. Azt feltételezik, hogy a PACAP27 és a PACAP38 egymástól független módon hasítódik le a PACAP-prekursor proteinekből, azaz nem alternatív splice variánsokról van szó (Miyata és mtsai 1990; Hosoya és mtsai 1992). Gerincesekben 90 %-ban a 38 aminosavas forma dominál (Vaudry és mtsai 2000b).

A PACAP gyors lebomlásáért a dipeptidyl peptidase (DPP)-IV felelős. A folyamat során rövidebb fragementek keletkeznek, melyek főleg antagonistaként viselkednek. Közülük a kísérletes vizsgálatokban leggyakrabban használt forma a PACAP6-38 (Bourgault és mtsai 2008).

1.2. A PACAP receptorok

A VIP és PACAP receptorok közül először a VPAC1-et, majd a VPAC2 fedezték fel (Ishihara és mtsai 1992; Lutz és mtsai 1993). Már a receptorok izolálásakor kiderült, hogy a VPAC receptorokat a VIP és a PACAP egyaránt aktiválja. A PAC1 receptort csak ezt követően azonosították (Pisegna és Wank 1993).

A PACAP 2-3-szor nagyobb affinitással kötődik saját receptorához, a PAC1 receptorhoz, mint a VIP, ezzel szemben a VPAC1 és VPAC2 receptorok azonos erősséggel kötik a két peptidet. Mind a három receptor a G protein-coupled receptor (GPCR) család tagja, amelyek egy extracelluláris N-terminális és hét transzmembrán doménből állnak. Számos splice-variánsuk is ismert, a legnagyobb számú, több mint tíz splice-variánssal a PAC1 receptor rendelkezik (Bourgault és mtsai 2011).

A PACAP receptorok szinte minden szervben expresszálódnak, azonban az altípusok eloszlása szervrendszerenként változó. PAC1 receptor mutatható ki a bulbus olfactorius, a cortex, a septum, az amygdala, a hippocampus, a thalamus, a hypothalamus, a substantia nigra, a cerebellum és a pons területén. VPAC receptorok találhatóak a bulbus olfactoriusban, a kéregben, a gyrus dentatusban, a tobozmirigyben és a thalamusban. A PAC1 receptor a VPAC receptoroknál magasabb koncentrációban van jelen a frontális cortexben, az amygdala mediális nukleuszában, a laterális hipotalamikus területeken és a cerebellumban (Joo és mtsai 2004; Vaudry és mtsai 2009). A perifériás szövetekben is azonosíthatók PAC1 receptorok, így például a perifériás idegrendszerben, az endokrin mirigyekben, a gonádokban, a placentában, a nyirokszervekben és az emésztőrendszerben. VPAC receptorok mutathatók ki a tüdőben, a belekben, a hasnyálmirigyben, a mellékvese kéregállományában, a herében, az ováriumban, a lép és a vese területén (Ishihara és mtsai 1992; Usdin és mtsai 1994; Filipsson és mtsai 1998).

Az egészséges szöveteken kívül a daganatok is expresszálják PACAP receptorokat, így prosztatata-, hasnyálmirigy- és hepatocelluláris karcinómákban, valamint a hypophysis adenómáiban és gliómákban is leírták jelenlétüket (Robberecht és mtsai 1982, 1993, 1994; Reubi és mtsai 1999, 2000; Collado és mtsai 2005).

1.3. A PACAP előfordulása a szervezetben

Először a központi idegrendszer PACAP tartalmú neuronjait térképezték fel. A PACAP legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban fordul elő, de megtalálható a kéregállomány, a középagy, az agytörzs, az amygdala, a bazális ganglionok, a hippocampus, a tobozmirigy, a kisagy és a híd területén is (Arimura és mtsai 1991; Hannibal 2002; Reglődi 2009). PACAP-immunreaktív rostok detektálhatók a perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok kisérzőidegsejtjeiben, valamint a vegetatív pre- és postganglionáris neuronokban (Köves és mtsai 1990).

A PACAP az idegrendszeren kívül szinte minden perifériás szervben kimutatható. Legmagasabb koncentrációban patkány herében mérhető, ahol mRNS-e a csírasejtekben detektálható (Arimura és mtsai 1991; Shioda és mtsai 1994). Ezenfelül azonosítható a petefészek, a méh, a méhlepény, a mellékvese, a mellékpajzsmirigy és az emlő szövetében, valamint a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek sejtjeiben is (Skakkebaek és mtsai 1999; Vaudry és mtsai 2009). PACAP tartalmú idegrostok találhatóak a gasztrointesztinális, a kardiovaszkuláris, az immun- és a légzőrendszerben (Uddman és mtsai 1991 a, b; Gaytan és mtsai 1994).

A PACAP, hasonlóan receptoraihoz, tumoros szövetekben is jelen van, így kimutatható gliómákban, neuroblasztómákban, emlő-, petefészek- és prosztatákarcinóma-sejtekben, valamint hipofízisadenómákban és feokromocitómás sejtekben is (Takahashi és mtsai 1993 a, b; Gutierrez-Canas 2003; García-Fernández és mtsai 2004; Szántó és mtsai 2012).

1.4. A PACAP élettani hatásai

A PACAP gyors degradációja ellenére jelentős biológiai aktivitással rendelkezik. Hatásairól bővebben a napjainkban gyakran idézett, Vaudry és mtsai által írt összefoglaló közleményben olvashatunk (Vaudry és mtsai 2009). Ezek közül a legfontosabbakat a teljesség kedvéért megemlítem, de részletesebben csak az értekezés szempontjából relevánsakkal foglalkozom.

1.4.1. A PACAP idegrendszeri és néhány további alapvető élettani hatása

A PACAP szerepet játszik számos élettani folyamat szabályozásában, így például a táplálkozásban, a termoregulációban, a cirkadián ritmus és az alvás szabályozásában (Gray és mtsai 2002; Hannibal 2006; Matsuda és Maruyama 2007; Murck és mtsai 2007; Matsuda és mtsai 2013). A PACAP- és PACAP receptor KO egerek jelentős memóriadeficitet mutatnak, ebből arra következtettek, hogy a PACAP serkenti a memóriafolyamatokat (Matsuyama és mtsai 2003). A PACAP tanulási folyamatokban kifejtett, filogenetikailag megőrzött szerepére utal, hogy csigákban cAMP-függő jelátviteli utakat aktiválva szabályozza a hosszú távú memória kialakulását (Pirger és mtsai 2010).

Endokrin hatásai is bizonyítottak, így a PACAP befolyásolja a hypophysis elülső és hátulsó lebeny hormonjainak szekrécióját. Intravénás adagolása után növekszik az adrenocorticotropic hormone (ACTH), a vazopresszin és a prolactin (PRL) szint (Chiodera és

mtsai 1995, 1996). A PACAP szabályozza a pajzsmirigyműködést, stimulálja a mellékvese katekolamin-szintézisét, valamint a hasnyálmirigy inzulintermelését (Chen és mtsai 1993; Isobe és mtsai 2003; Winsell és Ahren 2007).

1.4.2. A PACAP és a reprodukció

A reprodukció a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely által hormonálisan szabályozott folyamat, melyet a PACAP minden szinten képes befolyásolni.

A PACAP hypothalamus szintjén kifejtett hatását jól demonstrálja Kántor és munkatársainak vizsgálata, melynek során azt tapasztalták, hogy a PACAP a tüszőrepedést megelőzően az agykamrába juttatva gátolja az LH-csúcs kialakulását és blokkolja az ovulációt (Kántor és mtsai 2000a, b, 2001). Ez összhangban van azokkal a vizsgálatokkal, melyek szerint a PACAP csökkenti a hipotalamikus releasing faktorok, így a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) és luteinizáló-hormone-releasing hormone (LHRH) kibocsátását (Anderson és mtsai 1996; Köves és mtsai 2003).

Ezzel szemben a hypophysis szintjén a PACAP fokozza a gonadotropinok szintézisét és szekrécióját. Dózisfüggő módon serkenti a hypophysis folliculáris sejtjeinek interleukin (IL)-6 termelését, amely parakrin módon stimulálja a growth hormone (GH), a PRL, a follicle-stimulating hormone (FSH) és az LH elválasztását. Csökkent PACAP szint mérhető hipofizektómia után, amely FSH adására normalizálódik, bizonyítva a gonadotropinok kontrollját (Shuto és mtsai 1995a, b). Az LH-csúcs vonatkozásában a hypophysis szintjén a PACAP a GnRH potencírozásán keresztül a korábban elmondottakkal ellentétes hatást fejt ki, ugyanis képes emelni a GnRH stimulált cAMP, az inositol triphosphate (IP) és a cyclic guanosine monophosphate (cGMP) termelődést, amely LH-csúcs kialakulásához vezethet (Schomerus és mtsai 1994; Larivière és mtsai 2006). A PACAP GnRH-t potencírozó hatását magyarázhatja az is, hogy a peptid képes serkentenit a hypophysis GnRH receptorok expresszióját (Garrel és mtsai 2002).

A női gonádokon a PACAP serkenti a granulosa sejtek szteroidszintézisét és túlélését (Zhong és Kasson 1994; Lee és mtsai 1999). Újszülött nőtény patkánynak adagolva késlelteti a pubertást, a tubamotilitásra hatva növeli a megtermékenyülés valószínűségét és elősegíti a beágyazódást (Fahrenkrug és mtsai 1996; Köves és mtsai 1998; Vincze és Köves 2001). Terhesség esetén magas PACAP szint mérhető az uteroplacentáris egységben (Steenstrup és mtsai 1996). A human chorionic gonadotropin (hCG) átmenetileg emeli a PACAP és a

progeszteron receptor mRNS expressziót, amely a stimulációt követően 3, illetve 6-12 óra múlva éri el csúcspontját. Ha a progeszteron receptort antagonistával blokkolják, akkor nem tapasztalnak változást a PACAP gén expressziót illetően. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PACAP transzkripció a progeszteron receptor aktivációjához kötött (Ko és mtsai 1999; Reglődi és mtsai 2012).

A férfi gonádokon a PACAP serkenti a spermiogenezist. Leydig sejt kultúrán végzett kísérletek bizonyítják szteroidszintézist stimuláló hatását (Romanelli és mtsai 1997). Sertoli sejteken emeli a cAMP szintet és stimulálja az ösztadiol és az inhibin szintézisét (Heindel és mtsai 1992). A PACAP megtalálható a mellékhere tubulusokban és parakrin módon szabályozza a spermiumok érését (Zhou és mtsai 1997). Munkacsoportunk vizsgálatai szerint a PACAP serkenti a spermiumok motilitását. A PACAP KO egerekből származó spermiumok fejátmérője a vad típusú egerekhez viszonyítva kisebb, amely magyarázhatja az állatok csökkent fertilizációs képességét (Brubel és mtsai 2012). Humán kísérletek bizonyítják a PACAP/VIP erekcióban betöltött szerepét is, felvetve az impotencia kezelésében történő alkalmazhatóságuk lehetőségét (Gozes és Fridkin, 1992; Hedlund és mtsai 1994, 1995).

1.4.3. A PACAP általános citoprotektív hatása és szerepe az apoptózis folyamatának befolyásolásában

Neurális sejtvédő hatását számos *in vitro* és *in vivo* kísérletben vizsgálták. A PACAP védelmet nyújt agyi ischaemia, neurodegeneratív betegségek és agyi trauma állatkísérletes modelljeiben (Uchida és mtsai 1996; Farkas és mtsai 2004; Reglődi és mtsai 2004; Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004; Tamás és mtsai 2006, 2012; Dogrukol-Ak és mtsai 2009). Nem sokkal a PACAP felfedezését követően kimutatták, hogy a peptid rendkívül erős antiapoptotikus hatást fejt ki a kisagyi szemcsesejteken és az agyalapi mirigy adenómasejtjein (Cavallaro és mtsai 1996; Chang és mtsai 1996; Oka és mtsai 1999).

A PACAP apoptózist gátló hatása azonban nem csak neurális, hanem egyéb sejteken is megfigyelhető, így T-limfocitákon, preovulációs tüsző és tüdő alveoláris sejteken (Lee és mtsai 1999, Delgado és Ganea 2001; Onoue és mtsai 2004; Masmoudi-Kouki és mtsai 2011). Kardiomiocitákon, egér hemangioendotelióma és humán pigment epiteliális sejteken végzett kísérletek azt mutatták, hogy a PACAP növeli a sejttúlélést az oxidatív stresszel szemben (Gasz és mtsai 2006; Rácz és mtsai 2007; Mester és mtsai 2011; Fábrián és mtsai 2012).

A PACAP sejtvédő hatását az antiapoptotikus fehérjék [B-cell lymphoma (Bcl)-2, extracellular-signal-regulated kinase (ERK1/2), protein kinase B (PKB/Akt)] expressziójának növelésén, valamint a proapoptotikus faktorok [kaspáz-3, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-Jun N-terminal kinases (JNK), Bcl-2-associated death promoter (Bad), Bcl-2-associated X protein (Bax), hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α)] és számos hőszokk fehérje aktivitásának csökkentésén keresztül fejti ki (Vaudry és mtsai 2009).

Mindezek arra utalnak, hogy a PACAP általában citoprotektív, de tumorsejteken ezzel ellentétes irányú hatásai is lehetnek, így mielómás és mieloid leukémiás sejteken proapoptotikus, ezzel szemben inzulinóma, prosztatata- és kólonkarcinoma sejtjein pedig antiapoptotikus (Le és mtsai 2002; Gutierrez-Canas és mtsai 2003; Hayez és mtsai 2004; Li és mtsai 2006; Onoue és mtsai 2008). A PACAP nem befolyásolta a sejtélétést hasnyálmirigyből származó tumor- és metotrexát indukálta koriokarcinómasejteken (Brubel és mtsai 2010; Rékási és mtsai 2011).

1.4.4. A PACAP és a sejt differenciálódás

A PACAP *in vitro* kísérletekben az alkalmazott koncentrációtól függően képes differenciációt indukálni. Alacsony, subnanomoláris dózisban sejt proliferációt, magasabb dózisban pedig differenciációt idéz elő (Vaudry és mtsai 2009). Néhány példát kiragadva megemlítendő, hogy asztrocita irányú differenciációt indukál kortikális prekursor és neurális őssejteken, illetve neurális differenciációt kisagyi szemcsesejteken, kortikális prekursorokon, csirkék hátsó gyöki idegdúcaiban, humán neuroblasztóma sejteken, egér embrionális őssejteken és PC12 feokromocitóma sejteken (Lu és DiCicco-Bloom 1997; Nicot és mtsai 2002; Vallejo és Vallejo 2002; Cazillis és mtsai 2004; Nielsen és mtsai 2004; Ohno és mtsai 2005; Wang és mtsai 2005; Monaghan és mtsai 2008).

Nem neurális sejt vonalak esetében a PACAP gátolja az oszteoblasztok differenciálódását, blokkolja az egyrétegű lapos granulosa sejtekből álló premordiális tüsző elsődleges, kuboid sejt tüszővé alakulását és serkenti a T-sejtek érését (Delgado és mtsai 1996; Nagata és mtsai 2009; Latini és mtsai 2010).

1.5. PACAP a testnedvekben

A PACAP különböző szervekben és szövetekben történő kimutatása mellett a szervezet nem sejt kompartmentjeinek vizsgálatával is értékes adatok nyerhetők, melyek arra utalnak,

hogy a PACAP számos további élettani és kórtani folyamatot befolyásolhat. Munkacsoportunk ezen a területen az elmúlt években jelentős számú vizsgálatot végzett, ezeknek a bemutatása előtt azonban érdemes röviden említést tenni más kutatók eredményeiről is.

Az irodalomban fellelhető egyik korai közleményben patkányok hipofízisének portális keringéséből nyert vér PACAP38 koncentrációját hasonlították a perifériás vérben mért értékekhez radioimmunoassay (RIA) segítségével. A PACAP38 a portális keringésben szignifikánsan magasabb volt, bizonyítva a peptidnek a hipotalamikus idegvégződésekből történő felszabadulását (Dow és mtsai 1994).

Egy másik vizsgálatban lamivudinnal kezelt krónikus hepatitiszes betegek plazma PACAP38 koncentrációját mérték RIA-val (Elefsiniotis és mtsai 2003). A hepatitiszes betegek plazma PACAP38 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges önkénteseké, és ezen értékek a lamivudin terápiát követően jelentősen emelkedtek. Adataikat összekapcsolva korábbi kísérleti eredményekkel arra következtettek, hogy a PACAP a Th2-es típusú citokinek termelődésének serkentésén keresztül a T-sejtes immunválasz megváltozását idézi elő, és ez a hepatitisz biokémiai és szövettani remissziójához vezet (Delgado és mtsai 2000; Elefsiniotis és mtsai 2003).

Poszttraumás stressz szindrómában, nők esetében a betegség tünetei pozitív korrelációt mutattak a PACAP plazma szintjével. A PACAP és receptora hasznos biomarkerként szolgálhat ebben a betegségben (Ressler és mtsai 2011).

A PACAP jelenlétét bizonyították a gerincvelői folyadékban is, szintje sclerosis multiplex (SM)-ben szenvedő betegekben csökkent. A csökkent PACAP szint downregulálhatja a SM-re jellemző autoreaktív Th1 és Th17 sejtek számát, fokozva a neuroprotekción (Baranowska-Bik és mtsai 2013).

A plazma PACAP38-immunreaktivitás (PACAP38-IR) szignifikáns csökkenését figyelték meg migrén interiktális periódusában, ezzel szemben szignifikáns emelkedés volt tapasztalható az iktális fázis során. Az interiktális plazma PACAP38-IR negatív korrelációt mutatott a migrén időtartamával. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy összefüggés van a plazma PACAP38-IR és a migrén egyes fázisai között (Tuka és mtsai 2013).

Saját vizsgálataink során tömegspektrometriával és szövetekre kidolgozott specifikus és érzékeny RIA módszerrel igazoltuk a PACAP38 jelenlétét különböző testnedvekben

(emberi és állati vérplazmák, petefészek tüsszofolyadék) (Börzsei és mtsai 2009; Brubel és mtsai 2011; Czeglédi és mtsai 2011; Koppán és mtsai 2012).

Meghatároztuk az egészséges női és férfi önkéntesek átlagos plazma PACAP38-IR-át és figyelemmel kísértük annak különböző élettani paraméterekkel összefüggő változásait (Börzsei és mtsai 2009). Azt tapasztaltuk, hogy a felnőttek és az újszülöttek perifériás vérében a PACAP38-IR azonos. A köldökzsinór erek PACAP38-IR szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a perifériás vérben, és alacsonyabb a köldökvénában, mint az artériában. Ezek alapján a PACAP fötális szintézise tételezhető fel (Reglődi és mtsai 2010).

Mivel a PACAP eleget tesz a hipofizeotrop hormonokkal szemben támasztott követelményeknek, ezért vizsgáltuk a PACAP plazma szintjének változását a hypothalamo-hipofizeális tengely túlstimulációjával járó állapotokban is, így a terhesség, a szülés és a szoptatás során. A második és a harmadik trimeszterben az anyák plazmamintáiban szignifikánsan magasabb PACAP38-IR volt mérhető, mint az első trimeszterben és az egészséges, nem terhes nőkben. A placentában és egyéb anyai szervekben a terhesség során az átlagosnál nagyobb mértékű peptidszintézis folyik, és ezzel összhangban növekszik a placenta PACAP tartalma a terhesség előrehaladtával (Brubel és mtsai 2010). Vizsgálataink során azt észleltük, hogy szüléskor a PACAP38-IR 70 %-os csökkenést mutatott, és 1-3 nap múlva tért vissza az átlag populációval megegyező értékre (Reglődi és mtsai 2010). A fiatal egészséges női populációhoz viszonyítva mérsékelt, de szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető 1-6 hónapja szült szoptató anyák plazma PACAP38-IR szintjében (Börzsei és mtsai 2009). Az adatok alapján ugyan nem vonható le messzemenő következtetés a PACAP fiziológiai folyamatokban betöltött szerepére vonatkozóan, azonban méréseink bizonyítják, hogy az endogén PACAP38 szintek a hormonális változásokra érzékenyen reagálnak.

Tömegspektrometriás módszerrel vizsgáltuk a PACAP38 esetleges jelenlétét emberi csarnok- és magzatvíz, valamint hüvely-, nyál-, orr- és ondóváladékban is, de PACAP38-ra jellemző csúcs nem volt detektálható ezekben a mintákban (Brubel és mtsai 2011, 2012).

A vérplazmában és a különböző testnedvekben kimutatott PACAP és a tejben lévő bioaktív anyagokkal kapcsolatos irodalmi adatok figyelmünket a tejek és tejalapú készítmények vizsgálati lehetőségeire irányította. Mielőtt ezeknek a vizsgálatainknak a bemutatására sor kerülne, röviden összefoglalom a tej és tejalapú készítmények összetételére vonatkozó és a tanulmány szempontjából releváns ismereteket.

1.6. Bioaktív anyagok a tejben és tejalapú készítményekben

1.6.1. Az anyatej összetétele és annak változása a szoptatás során

Az anyatejben előforduló legfontosabb bioaktív anyagokat az 1. táblázat tartalmazza. Ezek között nem csak peptidek, hanem számos, az értekezésben szereplő citokin, növekedési faktor és egyéb hormon is feltüntetésre került (Grosvenor és mtsai 1993).

1. táblázat. Bioaktív anyagok az anyatejben.

CITOKINEK	NÖVEKEDÉSI FAKTOROK	PEPTIDEK	HORMONOK		
			HIPOTALAMIKUS	HIPOFIZEÁLIS	PERIFÉRIÁS
IL-1 β	IGF-I és II	VIP	TRH	TSH	T3
IL-2	IGFBP	bombesin	GnRH	FSH	T4
IL-4	NGF	CCK	GHRH	LH	rT3
IL-6	EGF	gasztrin		GH	kalcitonin
IL-8	TGF α	GIP		ACTH	PTH
IL-10	TGF β	substance P		PRL	PTHrP
G-CSF	PDGF	neurotenzin		oxitocin	ösztadiol
M-CSF	VEGF	galanin			ösztrol
INF γ	HGF	SOM			progeszteron
TNF α		motilin			tesztoszteron
		β -kazomorfin			kortikoszteron
		endothelin-1			D-vitamin
		ANP			kortizol
		PACAP			leptin
					ghrelin
					inzulin
					adiponektin
					prosztaglandinok

Az anyatej összetétele dinamikusan változik a szoptatási periódus alatt és egy szoptatás alkalmával is (Catinella és mtsai 1996). A szoptatási periódus 1-3 napjában termelődő kolosztrum szignifikánsan magasabb koncentrációban tartalmaz motilint, gastrint, leptint és β -kazomorfin-5-öt és -7-et (Lu és mtsai 1995; Jarmołowska és mtsai 2007; Eilers és mtsai 2011). A szoptatás elején termelődő előtejben az endothelin-1, a ghrelin és a koleszterol koncentrációja magasabb, ezzel szemben alacsonyabb triglicerid, leptin és retinol szint mérhető a szoptatás végén termelődő utótejben. Azonos nátriuretikus peptid és granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) koncentráció mérhető az elő- és az utótejben (Ken-Dror és mtsai 1997; Calhoun és mtsai 1998; Ribeiro és Dimenstein 2004; Karatas és mtsai 2011).

1.6.2. Az anya- és tehéntej, valamint a tehéntej alapú készítmények eltérő összetétele

Az anyatej és a tehéntej összetétele eltérő, így például a tehéntej alacsonyabb koncentrációban tartalmaz parathyroid hormone-like protein (PLP)-t, azonban epidermal growth factor (EGF) tartalmuk megegyezik (Budayr és mtsai 1989; Xiao és mtsai 2002). A pasztörizált, kereskedelmi forgalomban kapható tejek transforming growth factor (TGF)- β 1 tartalma alacsonyabb, mint a friss tehéntejé (Peroni és mtsai 2009).

Az anyatej összetétele különbözik a tehéntej alapú tápszerektől is, amennyiben a tápszerekben nem detektálható GnRH, insulin-like growth factor (IGF)-1, substance P és CGRP (Juskevich és Guyer 1990; Grosvenor és mtsai 1993; Ducroc és mtsai 1995). Ellentétben ezekkel, mérhető koncentrációban van jelen PLP, parathyroid hormone-related protein (PTHrP), EGF, inzulin és ghrelin (Read és mtsai 1985; Budayr és mtsai 1989; Onda és mtsai 2010; Savino és mtsai 2011). A tápszerek szignifikánsan magasabb koncentrációban tartalmaznak ghrelint és leptint, mint az anyatej (Lage és mtsai 2002; Savino és mtsai 2011).

1.6.3. Neuropeptidok a tejben

Figyelemre méltó, hogy a tejben számos neuropeptid is azonosítható (Grosvenor és mtsai 1993). Ezek közül részletesebben csak a VIP-re és a PACAP-ra vonatkozó adatokat ismertettem.

A PACAP-hoz szerkezetileg legjobban hasonlító VIP-et 1970-ben fedezték fel (Said és Mutt 1970), és csak másfél évtizeddel később derült ki, hogy a VIP jelen van az anyatejben (Werner és mtsai 1985). A vérplazmában értéke alacsonyabb, mint a tejben (Eriksson és Uvnäs-Moberg 1990). A PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy hasonlóan az egyéb tejben előforduló neuropeptidekhez, a VIP mRNS-e nem detektálható az emlőben, így a tejben felhalmozódott VIP is az anyai keringésből származhat (Koch és mtsai 1991). A VIP koncentrációja a szopatás során változik, szignifikánsan magasabb értéket mértek a főcstejben, mint a normál tehéntejben (Takeyama és mtsai 1990). Vagus ingerlés hatására a szopás alatt a plazmakoncentrációja növekszik, vagotomia esetén ez az emelkedés elmarad (Eriksson és mtsai 1994). Egyes fajokban lokálisan termelődő neurogén faktorok által közvetített, oxitocintól független tejkilövellést észleltek, amely felveti, hogy a VIP is szerepet játszik az ejakció kiváltásában (Cowie 1974).

A PACAP jelenlétét az anyatejben munkacsoportunk vizsgálatai (tömegspektrometria, RIA) igazolták, melyek során nem csak az anyatej PACAP38-IR szintjét mértük, hanem

összevetettük ugyanazon szoptató anyák plazmamintáival. Azt tapasztaltuk, hogy a tejben a PACAP38-IR 5-20-szor magasabb, mint a hozzá tartozó plazmamintákban (Börzsei és mtsai 2009). A humán tej- és plazmamintákon nyert eredményeinket alátámasztják háziállatokon (tejelő barna magyar kecske, magyar merinói juh, holstein-fríz szarvasmarha) végzett kísérleteink. A PACAP a humán mintákhoz hasonló felhalmozódást mutatott az állatok tejében, a legmagasabb PACAP38-IR értékek a juh- és a kecsketejben voltak detektálhatók (Czeglédi és mtsai 2011).

A tejben kimutatott PACAP felvetette azt a kérdést, hogy lehet-e a peptidnek szerepe az emlőszövetben zajló proliferációval és differenciálódással összefüggő változásokban. A következőkben ezért a PACAP és receptorainak az emlőszövetben történt kimutatásával kapcsolatos adatokat és az emlőhámsejtek laktogén differenciálódására vonatkozó legfontosabb ismereteket tárgyalom, amelyek a tanulmány vizsgálatainak tervezéséhez és eredményeinek későbbi interpretációjához nélkülözhetetlenek.

1.7. PACAP és PACAP receptorok, valamint egyéb neuropeptidek az emlő szövetében

Az emlőben fellelhető subepidermális idegvégződésekben, a mellbimbó simaizom sejtjei körül, a ductus lactiferus és az ahhoz tartozó alveolusokat körülvevő kötőszövetben neuropeptidek azonosíthatók, így calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P, VIP, peptide histidine isoleucine (PHI), neuropeptid Y (NPY), galanin és tyrosine hydroxylase (TH) pozitív rostok figyelhetők meg (Eriksson és mtsai 1996; Pinho és Gulbenkian 2007).

Az emlő idegrostjai nem csak a felsorolt neuropeptideket tartalmazzák, hanem bennük PACAP-szerű immunreaktivitás is kimutatható. A PACAP jelenléte szöveti RIA méréssel is bizonyítható és értéke szignifikánsan magasabb a laktáló, mint a nem laktáló emlőben. Ez a RIA méréssel észlelt különbség egyszerű immunhisztokémiai eljárással azonban nem detektálható (Skakkebaek és mtsai 1999).

A PACAP receptor expresszióját korábban kimutatták normál és tumoros emlőből származó epitelsejteken, valamint laktáló emlőben is (Garcia-Fernandez és mtsai 2005; Czeglédi és mtsai 2011).

1.8. Az emlőhámsejtek laktogén differenciálódásának szabályozása

1.8.1. A laktogén differenciálódás hormonális szabályozása

Terhesség során ösztrogén, progeszteron és PRL hatására a mirigysejtek differenciációt és proliferációt mutatnak és megkezdődik a szekrénum termelése. Az emlő laktogén differenciálódásnak alapvető, hormonálisan szabályozott folyamata során a PRL saját receptorához való kötődése a receptor homodimerizációját okozza, amely magának a receptornak és a Janus kinase (JAK) keresztfoszforilációját eredményezi. Ezt követően a monomer formában a citoszólban lévő signal transducer and activator of transcription (STAT)-5 dimerizálódik és szintén foszforilálódik, majd a dimer transzlokálódik a nukleuszba, kötődik a GAS régióhoz (TTCCNGGAA) és megindítja a tejfehérjék [β -kazein, whey acidic protein (WAP), β -laktoglobulin] és a STAT5 átíródását (Watson és Burdon 1996; Brisken és mtsai 2002a). A STAT5 fehérje kiemelkedő szerepét jelzi, hogy klónozásakor „mammary gland factor”-nek nevezték. A PRL receptorához való kötődése további fontos jelátviteli utakat [MAPK, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)] is aktivál (Brisken és mtsai 2002a). A STAT5-től független jelátvitel fontosságára hívja fel a figyelmet az a tény, hogy az IL-2 indukált suppressor of cytokine signaling (SOCS) foszforiláció szelektív STAT5 gátlást eredményez a MAPK jelátviteli útvonal gátlása nélkül (Cacalano és mtsai 2001).

1.8.2. Egyéb faktorok szerepe az emlőhámsejtek differenciálódásában

A differenciálódás folyamatát hormonokon kívül növekedési és transzkripció faktorok, citokinek, valamint angiogénikus faktorok is befolyásolják (Desrivière és mtsai 2003; Hynes és Watson 2010; Watson és mtsai 2011). Az emlő differenciációjában a STAT5 fehérjén kívül a STAT6, az involúció során bekövetkező változások szabályozásában pedig a STAT3 is szerepet játszik. Az IL-4 és IL-13 a STAT6 fehérjén keresztül fejtik ki hatásaikat. A citokinek szerepét a differenciálódásban alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a STAT6 és IL-4/IL-13 kettős KO egerekben a vemhesség alatt az alveoláris morfogenezis és a differenciáció egyaránt csökkent, ennek ellenére mind a STAT6, mind az IL-4/IL-13 dupla KO egerek képesek szoptatni (Chapman és mtsai 1999; McKenzie és mtsai 1999; Khaled és mtsai 2007).

A differenciáció során az emlősejtek által termelt citokinek a „T-helper” sejtek differenciálódásához hasonló Th1/Th2 citokin váltást mutatnak, amely az IL-12, az interferon (INF)- γ és a tumor necrosis factor (TNF)- α expressziójának csökkenésében, illetve az IL-4, IL-13 és IL-5 emelkedésében nyilvánul meg (Khaled és mtsai 2007). A PACAP is képes serkenteni a Th2 és csökkenteni a Th1 citokinek termelődését (Delgado és mtsai 2000), ezért

felvetődik a lehetőség, hogy esetleg az IL-ek modifikálásán keresztül hatást gyakorolhat az emlőhámsejtek differenciálódására.

1.8.3. Neuropeptidek és az emlőhámsejtek differenciálódása

Egyes neuropeptidek közvetlenül is befolyásolhatják a laktogenezist. A galanin nevű neuropeptid, amely a hypophysis laktotróp sejtjeiben szintetizálódik, tárolódik és szekretálódik, nem csak stimulálja a PRL szekrécióját, hanem közvetlen hatást gyakorol az emlőhámsejtekre, előmozdítva az alveoláris morfogenezist (Koshiyama és mtsai 1987; Naylor és mtsai 2003). Vemhes egerekben a hypophysis galanin tartalma emelkedett, ezzel szemben a szoptatás során a galanin jelentős csökkenése figyelhető meg a hypothalamus magnocelluláris neuronjaiban. Exogén ösztrogén kezelés 6-szorosára emeli a laktotróp sejtek számát, 3000-szeresére a galanin mRNS tartalmat és 500-szorosra a fehérje expresszót. A galanin KO egerek megkésett lobulo-alveoláris emlő struktúrát mutatnak a csökkent keringő PRL-nak köszönhetően. „Whole mount” hisztológiai vizsgálatok bizonyítják a csökkent duktális elágazódást, melyek hasonlítanak a PRL és PRL receptor KO egerekéhez. Ösztrogén hatására bizonyos emlőtumorokban is megnő a galanin szint (Wynick és mtsai 1998).

A PACAP képes befolyásolni a differenciálódást nem neurális sejtvonalakon is. Egér kálváriából izolált oszteoblaszttenyészeteken végzett kísérletekben azt észlelték, hogy a differenciáció során a VPAC2 receptor upregulálódik. Az oszteoblasztsejtekben a PACAP a cAMP szint emelésén keresztül gátolja a sejtek differenciálódását, amely az alkalikus foszfatáz mRNS expressziójának csökkenésében nyilvánul meg (Nagata és mtsai 2009). A receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) és ligandja (RANKL) fontos szerepet tölt be a csontmetabolizmus és az emlőmirigy fejlődésében egyaránt. RANK és RANKL KO egerek emlőhámja nem képes lobulo-alveoláris struktúrát kialakítani, és az ilyen egerek képtelenek a szoptatásra. A felsorolt adatok a két szerv evolúciós hasonlóságára utalnak (Schramek és mtsai 2011).

1.9. Célkitűzéseink és vizsgálataink

A fentiekből kiindulva kíváncsiak voltunk arra, hogy mutat-e a PACAP, más korábban felsorolt bioaktív anyagokhoz hasonlóan, koncentráció-változásokat a szoptatás során; detektálható-e PACAP38-IR a kereskedelmi forgalomban lévő tejekben, tejporokban és tápszerekben; eltér-e a PAC1 receptor expressziója különböző fajokból származó és eltérő hormonális hatások alatt álló szöveti- és sejtmintákban és van-e hatása az emlőszövetben és

tejben egyaránt jelenlévő PACAP-nak az emlőszövetet érintő fiziológias változásokra, így az emlőhámsejtek differenciálódására.

- PACAP-RIA-val mértük a kolosztrum, az átmeneti és az érett anyatej PACAP38-IR-szintjét és vizsgáltuk annak változását hosszú távú követés során, valamint az elő- és az utótejben.
- Vizsgáltuk a PACAP-IR-t friss és pasztörizált tehéntejekben, tápszerekben és tejporokban. Kvalitatív tömegspektrometriás mérést alkalmaztunk annak igazolására, hogy a tápszermintákban a RIA-val mért immunreaktivitás valóban a PACAP38-nak felel meg és nem az antitest más, hasonló molekulával létrejött keresztreakciójának eredménye.
- Vizsgálataink során összehasonlítottuk a birkából származó laktáló és nem laktáló emlőszövetek PAC1 expresszióját és megfigyeléseinket összevetettük nem laktáló humán emlő mintákkal. Kíváncsiak voltuk arra, hogy a PAC1 receptor expressziója az emlőhámsejtek konstitucionális sajátossága-e, ezért a tanulmányban szereplő kísérletekben felhasznált egér emlőhámsejtek mellett sort kerítettünk más, az értekezésben nem szereplő vizsgálatainkban felhasznált tenyésztett humán daganatos és nem daganatos emlősejtek PAC1 receptorainak konfokális mikroszkópos elemzésére is.
- Vizsgáltuk, hogy a PACAP kezelés befolyással van-e a β -kazein termelésére, valamint a STAT5 függő és független differenciálódási útvonalakra. Kísérleteink során egér emlősejtek PRL indukálta differenciálódását a β -kazein tejfehérje kimutatásával igazoltuk és a differenciálódási útvonalak (STAT5, p38 MAPK és Akt) aktiválódását Western blot-tal detektáltuk.
- Citokin és angiogenezis array kit-ek segítségével követtük nyomon, hogy milyen hatással bír a PACAP differenciálatlan és differenciált egér emlőhámsejtek cito- és kemokin, valamint növekedési és angiogénikus faktor szekréciójára.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Mintagyűjtés

2.1.1. Anyatej minták gyűjtése

Az érett anyatej (a szoptatás 14. napjától annak befejezéséig termelődő tej) PACAP38-IR méréséhez egészséges, érett csecsemőt világra hozó, nem dohányzó szoptató anyáktól származó 5 ml-nyi anyatejet használtunk (n = 167), amelyeket a Pécsi Egyesített Egészségügyi Intézmények védőnői hálózata biztosított számunkra. Az anyák beleegyező nyilatkozatot és kérdőívet töltöttek ki, melyben szoptatási és hozzátáplálási szokásaikra, valamint életvitelükre kérdeztünk rá (*lásd melléklet*).

Az 1 ml kolosztrum (n = 11; az első három napban termelődő tej) és az átmeneti anyatej (n = 8; a szoptatás 4. napjától annak 14. napjáig termelődő tej) mintákat a PTE Klinikai Központ Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük. Az átmeneti anyatejmintákat ugyanazoktól a szoptató anyáktól nyertük, akik korábban kolosztrum mintákat is adtak. Egyazon anyákat kerestük fel az 5 ml előtej (n = 4; közvetlenül a szoptatást megelőzően lefejt tejminta) és utótej (n = 4; a szoptatás befejezését követően adott tejminta) gyűjtése érdekében.

A mintákat polipropilén csövekbe gyűjtöttük és peptidáz inhibitor nélkül -20 °C-on tároltuk.

Kísérletünkhöz rendelkezünk a szükséges etikai engedéllyel (PTE KK 3117).

2.1.2. Kereskedelmi forgalomban kapható tej alapú készítmények

A nem pasztörizált, friss tehéntej PACAP38-IR méréséhez 5 ml (n = 4; Nagybudmér, Baranya) 1-8 hónapja ellő Holstein-fríz/magyar tarka szarvasmarha keverékének tejét gyűjtöttük. Kereskedelmi forgalomban kapható pasztörizált bolti tejet, tejporokat és különböző márkájú hipoallergén (HA) és nem hipoallergén (non-HA) tápszereket vásároltunk. Pasztörizált bolti tejek: Tolle 2,8 %; Milli UHT 3,5 %; Pilos 2,8 %; Mizo UHT 1,5 %. Tejporok: Marvel sovány tejpor; NATURBIT sovány tejpor 1,5 %; Bedeco instant sovány tejpor; MIZO zsíros tejpor. Tápszerek: Beba Pro 1; Beba Pro HA; Nestlé Alprem; Milupa; Hipp Plus; Hipp Follow; Milumil 2 6 hó; Aptamil HA; Milumil HA Start Optima.

2.1.3. Laktáló és nem laktáló juh, valamint normál humán emlő minták

A laktáló és nem laktáló (n = 4) tőgy biopsziákat 3-4 éves magyar merinó juhoktól minimálisan invazív biopsziás tűkkel (Bard Magnum rendszer: 130 mm hosszú, 15 mm penetrációs mélységű), az ellést követő 7-30. napon a Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centrum, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézetében gyűjtötték. Mintavétel előtt az állatot stabilan rögzítették, tőgyét megtisztították és lidocainnal helyi érzéstelenítést alkalmaztak.

A humán emlőminták daganatos betegek műtéti anyagának tumormentes részeiből származtak, melyeket 4 %-os formalinban fixáltunk (n = 4, átlag életkor: 36,3 év). Etikai engedély: PTE KK 4304.

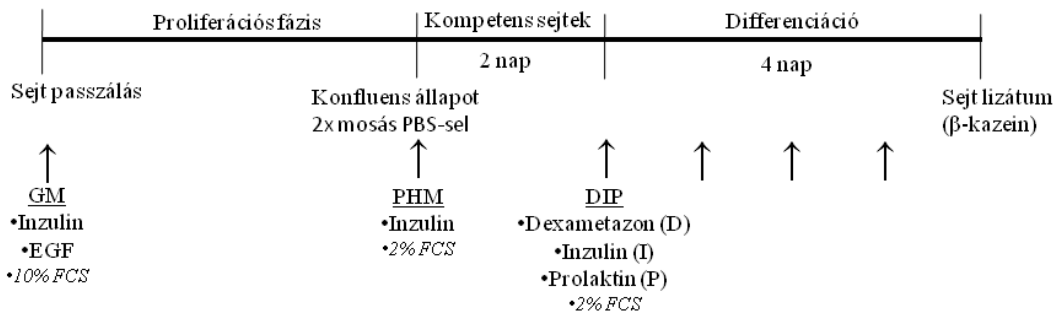
2.2. Sejtkultúrák

2.2.1. HC11 egér emlősejtek

A HC11 sejteket RPMI-1640 médiumban, 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett tenyésztettük, 10 %-os FCS, 5 µg/ml inzulin, 10 ng/ml EGF, 50 µg/ml gentamicin és glutamin jelenlétében (GM = growth medium). A sejteket 3-4 naponta passzáltuk.

2.2.2. HC11 egér emlősejt differenciáció

A sejteket 6 lyukú lemezre tettük (BD Bioscience), melyek GM-ban 2-3 nap alatt konfluensé nőttek. Ezután a sejteket 2-szer PBS-sel mostuk, hogy a médiumban lévő EGF-t eltávolítsuk, majd újabb 2 napos inkubáció következett az ún. pre-hormone médiumban (PHM). Ez tartalmaz: RPMI-1640-t, 2 % FCS-t, 5 µg/ml inzulint (I), 50 µg/ml gentamicint és glutamint. Ezt követően a PHM médiumot DIP médiumra cseréltük, amely 1 µM dexametazon (D) és 5 µg/ml prolaktin (P) hozzáadását jelentette a PHM médiumhoz, majd a DIP médiumot a következő négy napban az egyes kísérleteknek megfelelően naponta cseréltük (*1. ábra*).



1. ábra. HC11 egér emlősejteken indukált laktogén differenciálódás folyamatábrája.

2.2.3. Egyéb sejt kultúrák (HMEC, MCF-7 és MDA-MB-468)

Ezeket a sejt vonalakat egyéb, az értekezésben nem szereplő kísérleteinkben használtuk fel. Jelen tanulmányban csak PAC1 expressziójukra vonatkozó mikroszkópos vizsgálatok eredményeit szerepeltetjük.

A HMEC (Human Mammary Epithelial Cell) sejteket (Biocenter) Mammary Epithelial Cell Growth Medium (MEGMTM)-ban tenyésztettük, 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett, a hozzá szükséges borjú hypophysis extraktum, EGF, hidrokortizon, gentamicin és inzulin jelenlétében, melyeket a gyártó által forgalmazott BulletKitTM tartalmazott a megfelelő koncentrációkban.

Az MDA-MB-468 (ATCC) emlő tumoros sejteket Leibovitz's L-15-ös médiumban tenyésztettük, 10 %-os FBS jelenlétében, 37 °C-on, CO₂ nélkül.

Az MCF-7 emlő tumoros sejteket (ATCC) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-ban tenyésztettük, 10 %-os FBS, 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin jelenlétében, 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett.

2.3. PACAP-RIA

2.3.1. Minta előkészítés

A tápszereket standard hígításban oldottuk, 150 mg tápszerhez 1 ml forró desztillált vizet adtunk. Az 1 ml anyatej, friss és pasztörizált tehéntej, tejpor, valamint tápszer mintákhoz a fehérjék kicsapása érdekében 10 µl, 96 %-os ecetsavat adtunk, majd 40 °C-os vízben 5 percen

keresztül inkubáltuk. Ezt követően 4 °C-on, 20 percen át, 3000-es fordulatszámra centrifugáltuk úgy, hogy a tetején homogén zsírréteget, közepén vizes fázist (savó) és alul kicsapódott fehérjét nyerjünk. A leszívott, ám még mindig zavaros savót ismét centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 10 perc, 4 °C), majd a felülúszót használtuk a RIA meghatározásokhoz.

2.3.2. A PACAP38 antitest és a ¹²⁵I-dal jelölt PACAP előállítása

A „88111-3” PACAP38 antiszérumot nyulak immunizálásával, szintetikus peptid segítségével állították elő, melyet karbodiimiddal marha tireoglobulinhoz kapcsolnak. Keresztreakciós vizsgálatokkal igazolták, hogy az így nyert antitest nagy specificitású és a PACAP38 C-terminálisára érzékeny (Arimura és mtsai 1991). Az antitest sem a PACAP27-hez, sem más neuropeptidhez (VIP, glükagon, szekretin) nem mutatott kötődést (Jakab és mtsai 2004).

A mérésekhez használt PACAP38 antigén jelölése a PTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében történt. Frissen oldottak 20 µg iodogént 100 µl diklórmetánban, majd szárazra párolták nitrogén gáz alatt. Ezután hozzáadtak 80 µl, 0,25 mol/l (pH 7,4) foszfát puffert és PACAP24-38 peptidet (5 nmol/30 µl), valamint 18,5 MBq/5 µl Na¹²⁵I-ot. Szobahőmérsékleten a jelölődés 5 percig tartott. Az oxidációs folyamatot 400 µl, 0,1 % (v/v) TFA hozzáadásával szüntették meg, majd a monojódozott peptidet high-performance liquid chromatography (HPLC) oszlopon szeparálták. A kalibrációs görbe elkészítéséhez szintetikus peptidet használtak, melyet 0-1000 fmol/ml koncentrációban mértek az inkubációs oldatokba. A kimutatási határ 2 fmol/ml, az inter-assay variáció 48,6 ± 3,4 fmol/ml (Jakab és mtsai 2004).

2.3.3. RIA mérés

A polipropilén RIA csövekbe (Merck) duplikációban mértünk standardot (100 µl), vagy a mérni kívánt/ismeretlen mintát (200 µl), 100 µl antiszérumot, 100 µl (5000 cpm/cső) ¹²⁵I izotóppal jelölt antigént, majd az inkubációs elegyet a megfelelő assay pufferrel [0,05 mol/l (pH 7,4) foszfát puffer, amely tartalmaz 0,1 mol/l NaCl-ot, 0,25 % (w/v) BSA-t és 0,05 % (w/v) NaN₃-t] 1 ml térfogatra egészítettük ki. A mintákat az összekeverést követően 4 °C-on, 48-72 órán át inkubáltuk. Ezután az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót úgy választottuk el a szabad jelölt peptidektől, hogy a mintákba 100 µl szeparáló oldatot (10 g mosott szén/Norit A, Serva), 1g dextránt (Serva, molekulásúly: 50000-75000 Da), 0,5 g zsírmentes tejport és 100 ml desztillált vizet mértünk. A mintákat 4 °C-on, 20 percen át, percenként 3000 fordulattal centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük. A szénhez kötött szabad peptidfrakció radioaktivitását gamma számlálóval mértük NZ310 típusú spektrométeren. Ebből

következtettünk az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékére, majd a kalibrációs görbéről leolvastuk az ismeretlen minta PACAP38-IR értékét.

2.4. Tömegspektrometria

2.4.1. MALDI TOF/TOF

A széles tömegtartomány mérésére alkalmas Bruker Autoflex II. típusú matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI TOF/TOF) tömegspektrométer segítségével végeztük méréseinket. A műszer kimutatási tartományának alsó határa fmol nagyságrendű. A készülékkel megvalósítható a tandem tömegspektrometria (TOF/TOF), amely során az ionforrásból kilépő részecskéket két módon tudjuk fragmentálni: közvetlenül az ionforrás után az ún. post source decay (PSD), vagy argongáz segítségével az erre a célra kialakított ütközési cellában [collision induced decay, (CID)]. A műszerben két detektort alkalmaztunk. A kis tömegű ionokat a nagyobb úthosszú biztosító iontükrös (reflektoros) detektorban, a nagyobb tömegűeket pedig lineáris módban mértük.

2.4.2. Minta előkészítés

A minták előkészítése a RIA mérések során alkalmazott lépéseknek megfelelően történt. A kinyert savót ezután 10-szeresére hígítottuk 0,1 %-s TFA-val. A sóatlanításhoz és a zsírtalanításhoz ¹⁸C-as bevonatú ZIP-TIP pipettahegyet (Millipore) használtunk. A PACAP38 a ZIP-TIP felszínén kötődött meg, ahonnan azt a mátrix hidroxifahéjsav 50 %-os acetonitril és 0,1 %-os TFA (1/2 v/v) telített oldatával történő leoldás után közvetlenül detektálhattuk. Mérésünkhöz etanolban oldott hidroxifahéjsav matrixból vékony réteget csepegtettünk a Bruker rozsdamentes acéllemezre [massive target plate (MTP) 384, Bruker Daltonics], majd arra 1-1 µl mintát rétegeztünk. Kalibráló oldatként minden esetben a „Bruker Peptide” kalibráló standardot (#206195 Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics) és a PACAP38 vizes oldatát (Sigma-Aldrich) alkalmaztuk.

2.4.3. Tömegspektrometriás mérés

Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (MNL-205MC model, LTB-Lasertechnik Berlin GmbH), amelynek a frekvenciája 50 Hz, a gyorsító feszültség 20 kV, a késleltetési idő pedig 200 ns volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban, 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző

tömegspektrumokat (400 lövés/minta) összesítettük. A műszer ellenőrzését Bruker FlexContol 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük.

2.5. A PAC1 receptor mikroszkópos vizsgálata

2.5.1. A PAC1 receptor ellenes antitest előállítása

Primér antitestként nyúlban termelt anti-PAC1-R antitestet használtunk (Seiji Shioda ajándéka). Shioda és munkatársai az állatok immunizálását egy 14 aminosavból álló, szintetikus peptiddel végezték, amely a PAC1 receptor összes ismert splice variánsának N-terminális extracelluláris doménjén megtalálható. Teljes egéragy immunblot analízissel ellenőrizték az antitest specifitását, melynek során az antitest kötődését 55 kDa-nál, a PAC1 receptor molekulásúlyának megfelelően észlelték. A preabszorpciós kontroll egerek agykérgi metszetein történt, amelynek során a blokkoló peptid alkalmazása után a kortikális asztrocitákon jelölődés nem mutatkozott (Suzuki és mtsai 2003).

2.5.2. Fluoreszcens immunhisztokémia

Szekunder antitestként Alexa Fluor „568”-cal jelölt anti-nyúl antitestet (Southern Biotechnology) választottunk.

A vizsgálatainkhoz használt emlőmintákat 4 %-os PFA fixálást követően 6 x 10 percen át mostuk 0,1 M-os PBS-ben, majd 1 órán át inkubáltuk 10 %-os, majd 20 %-os szaharózos-PBS-oldatban (Sigma-Aldrich). A kriosztáttal (Leica) történő metszésig a preparátumokat kriosztát-médiumba (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek) ágyazva -20 °C-on tároltuk. A 12 µm-es metszeteket zselatinozott tárgylemezre (Superfrost, Spektrum-3D) vettük fel. A metszeteket a felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Az immunhisztokémiai eljárás első lépéseként a lemezeket nedves kamrában 6 x 5 percen át mostuk 1 %-os Triton-X-100 (Spektrum-3D) és PBS keverékével, ezután az aspecifikus reakciók blokkolása érdekében 1 órán át inkubáltuk normál kecske szérummal (100 µl/tárgylemez; Sigma-Aldrich), amelyet a primér antitesttel (1:100; 100 µl/tárgylemez) történő, egy éjszakán át tartó inkubáció követett. A második napon 6 x 5 percen át mostuk a metszeteket 0,2 M-os PBS-ben, majd 2 órán át szekunder antitesttel (1:1000; 100 µl/tárgylemez). Ezt 3 x 5 perces, 0,2 M-os PBS-es mosás követte, majd a metszeteket Fluoromount-G (Southern Biotechnology) géllal fedtük. A metszetek specifikus jeleit 568 nm hullámhosszon gerjesztettük és 603 nm emissziós tartományban Nikon Eclipse 80i

mikroszkóppal detektáltuk SPOT Basic 4.04 program segítségével. A primer antitest kihagyásával ellenőriztük, hogy a szekunder antitest ad-e aspecifikus jelet. A bemutatott fotók szerkesztése Adobe Photoshop 7.01 programmal történt.

2.5.3. *Fluoreszcens immuncitokémia*

Thermanox 10,5 mm × 22 mm-es fedőlemezeket (Nunc) méretre vágunk és 96 lyukú plate aljára helyeztük. Ezután a lemezeket 5 percen át, 200 µl 96 %-os etanollal mostuk, majd annak eltávolítása után 200 µl desztillált vízzel tisztítottuk, melynek leszívása után 200 µl, 13 µg/ml poli-l-lizinnel kezeltük (Sigma-Aldrich) és ezt követően 37 °C-os termosztátba helyeztük 30 percre. A polilizint háromszori desztillált vizes mosással távolítottuk el, ezután a lemezeket éjszakára UV fény alá helyeztük (Balogh és mtsai 2011). A sejteket 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a fentiek szerint előkészített 96 lyukú plateken, majd a következő nap 4 %-os PFA-ban fixáltuk, először 30 percen át, szobahőn, ezután 4 °C-on hűtőben. A PFA eltávolítása után a sejteket 5 percig PBS-sel mostuk és 1 órán keresztül 100 µl, 10 %-os BSA-val (Sigma-Aldrich) blokkoltuk az aspecifikus kötődéseket. Ezt követően adtuk a mintákhoz primér antitestként a nyúlban termelt anti-PAC1-R (1:100) antitestet és a készítményeket egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk. Másnap a sejteket 3 x 5 percen át mostuk és Cy3-konjugált „második” anti-nyúl IgG antitesttel (Millipore) 1:200 hígításban inkubáltuk 1 órán át, majd újabb 3 x 5 perces mosás következett. A fedőlemezeket ezután tárgylemezre helyeztük és Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a PAC1 receptor expresszióját (pinhole size: 80 µm; lézer transmisszió: 100 %; Cy3 excitációs hullámhossz: 543 nm; emissziós 567 nm; Hoechst excitációs hullámhossz: 405 nm; emissziós 461 nm; akkumulációs idő: 2 msec/pixel; step size: 1 µm; 20x objektív lencse).

2.6. Western blot

2.6.1. *Vizsgálati csoportok*

Western blot vizsgálatainkat HC11 A23-as és B22-es egér emlősejt klónokon végeztük, a következő kísérleti csoportok szerint:

- DIP kezelt HC11 sejtek
- DIP + 100 nM PACAP38 kezelt HC11 sejtek

- DI + 100 nM PACAP38 kezelt HC11 sejtek
- I + 100 nM PACAP38 kezelt HC11 sejtek
- I kezelt HC11 sejtek (csak PHM médiumot kapott)

A β -kazein expresszió Western blot analíziséhez a sejtízátumokat az 5. napon, a differenciációs útvonalak vizsgálatához pedig 20 perccel a különböző hormon kombinációs és PACAP38 kezelések után készítettük.

A sejteket háromszor PBS-ben mostuk, majd 30 percen át 4 °C-on lízis pufferben rázattuk [50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 25 mM β -glicerofoszfát, 1,5 mM MgCl₂, 10 % glicerol, 1 % Triton X-100, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 1 mM fenilmetilszulfonil fluorid, 1mM ditiotreitól, 1,19 mM Na₃VO₄, 2,5 mM NaF]. Ezután a lizátumokat centrifugáltuk (15300 fordulat/perc, 4 °C, 10 perc), hogy a feloldatlan részeket eltávolítsuk. A protein koncentrációt Bradford reagenssel határoztuk meg. A fehérjéket SDS-PAGE gél elektroforézissel szeparáltuk és Odyssey membránra blottoltuk. A membránokat 5 %-os tejjel blokkoltuk 1 órán át szobahőn, majd egy éjszakán át inkubáltuk a primér antitesttel. Másnap 3 x 10 perces TBS-T mosás után a megfelelő szekunder antitesttel inkubáltuk 30 percig szobahőn. A reakciót ECL Plus Western blotting detektáló rendszerrel vizsgáltuk (GE Healthcare).

A röntgenfilmeket transzmissziós módban szkenneltük. A pixel denzitásokat ImageJ szoftverrel analizáltuk.

2.6.2. Antitestek

Primér antitestek

antifoszfo-Akt (Thr308; Cell Signaling), 1:500

anti Akt-1 (C20; Santa Cruz Biotechnologies), 1:500

antifoszfo-p38 MAP Kináz (Thr180/Tyr182; Cell Signaling), 1:1000

anti-p38 MAP Kináz (Cell Signaling), 1:1000

antifoszfo-STAT-5 (Tyr694/699; Cell Signaling), 1:900

anti-STAT5 (Cell Signaling), 1:900

anti- α -tubulin (Santa Cruz Biotechnologies), 1:1000

anti- β -kazein (M-14; Santa Cruz Biotechnologies), 1:1000

Szekunder antitest

IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnologies)

2.7. Egér citokin és angiogenesis array

Az array vizsgálatokhoz a sejteket a β -kazein mérésekhez hasonló körülmények között tenyésztettük. A differenciált és a differenciálatlan HC11 sejtek által szekretált citokineket, kemokineket, növekedési és angiogenikus faktorokat a sejtek médiumából citokin és angiogenesis array-vel vizsgáltuk.

A szemikvantitatív módszer a nitrocellulóz membránokra előre duplikátumban kötött antitestek és a mintában lévő proteinek kötődésén alapul. Az array-ek szenzitivitása az egyes proteinek esetében eltérő, alacsony pg/ml-es tartományban van, detekciós maximuma 2-10 ng/ml, azonban ez a detekciós eljárástól és az expozíciós időtől függő. A kit tartalmazza a kísérlethez szükséges puffert, mosóoldatokat, detektáló antitest koktélt és a négy membránt.

Az array-eket a gyártó cég (R&D System) előírása szerint alkalmaztuk. Röviden, 1 órás membránblokkolást követően 500 μ l médiumot adtunk a membránokhoz, majd azokat detektáló koktél jelenlétében rázólemezen inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Másnap háromszori mosás után adtuk a rendszerhez a tormaperoxidázhoz konjugált streptavidint, melyet kemilumineszcens előhívás követett. A denzitometriás kiértékelést a korábbiaknak megfelelően végeztük el (lásd 2.6.1.), azoknak a membránpontoknak megfelelően, ahol szemmel látható változások történtek.

2.8. Statisztikai analízis

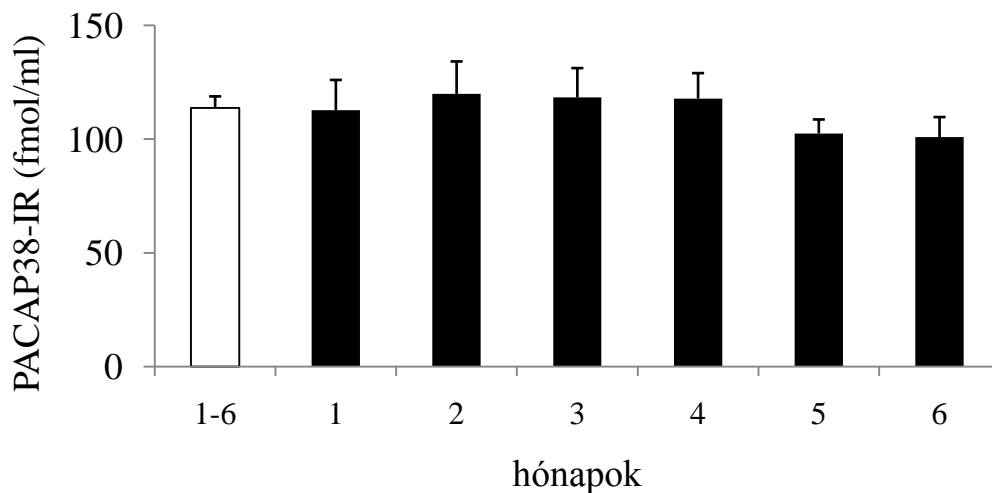
A humán anyatejminták statisztikai analíziséhez Friedman, a friss és pasztörizált tehéntej, tejpor, valamint tápszer esetében páratlan Student-t, a kitek-nél 1- illetve 2 utas ANOVA tesztet és Bonferroni post-hoc analízist használtunk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. PACAP38-IR anya- és tehéntejben, tejporokban, valamint tápszerekben

3.1.1. Humán tejminták

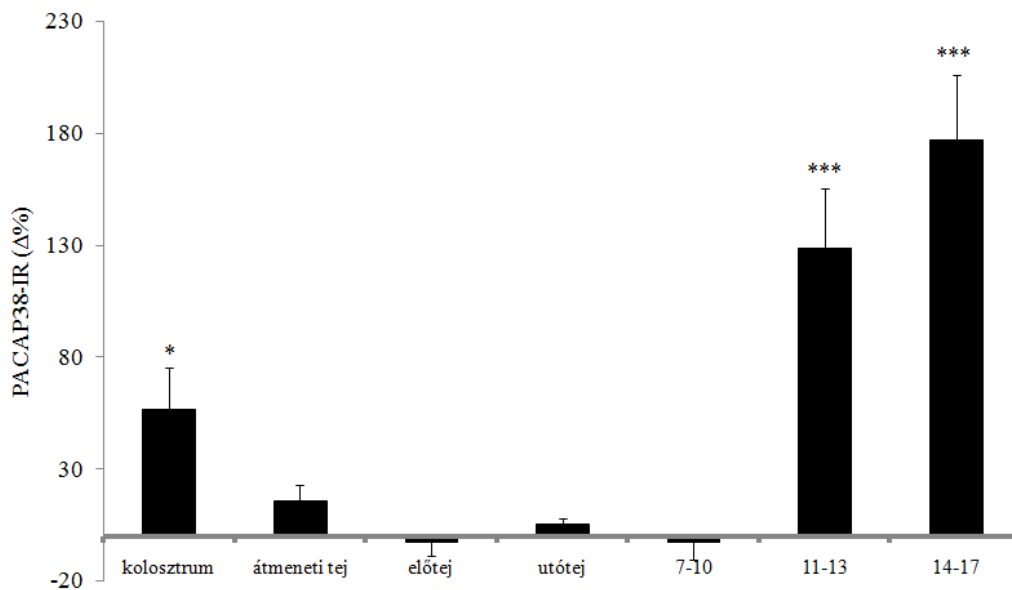
A PACAP38-IR az érett anyatejben a szoptatási periódus 1-6 hónapjában lényegében változatlan volt. Az érett tejmintákon végzett RIA méréseink átlagértéke: 112 ± 13 fmol/ml (2. ábra). Az egyéb tejmintákra és kereskedelmi forgalomban kapható tejalapú készítményekre vonatkozó vizsgálataink eredményeit a továbbiakban erre az értékre vonatkoztatva adjuk meg.



2. ábra. A PACAP38-IR változása az érett anyatejben a szoptatás első 6 hónapja alatt ($n_{1-6} = 75$; $n_1 = 15$; $n_2 = 15$; $n_3 = 15$; $n_4 = 13$; $n_5 = 9$; $n_6 = 8$). Az 1. hónapban gyűjtött érett tejminták kizárólag a szülést követő 14-30. nap között lefejt anyatejnek felelnek meg, azaz a szülést követő korai időszakból származó, átmeneti tejminták ebben a csoportban nem szerepelnek. Az oszlopokon az átlagtól való eltérések az átlag standard hibájaként (standard error of mean = SEM) vannak feltüntetve.

A tej érése során a PACAP38-IR csökkenő tendenciát mutatott, a kolosztrumban szignifikánsan magasabb volt, mint az érett anyatejben ($p < 0,05$). Az átmeneti tejben a PACAP38-IR csökkent, a változás azonban nem volt statisztikailag szignifikáns sem az érett anyatejhez, sem a kolosztrumhoz viszonyítva. A szoptató anyák tejjhozama a 10. hónapra megközelítőleg 1/3-ára csökkent. Szignifikánsan magasabb PACAP38-IR volt mérhető a 11-13. és a 14-17. hónapok közti időszak anyatejmintáiban, mint az 1-6. hónapok között gyűjtött

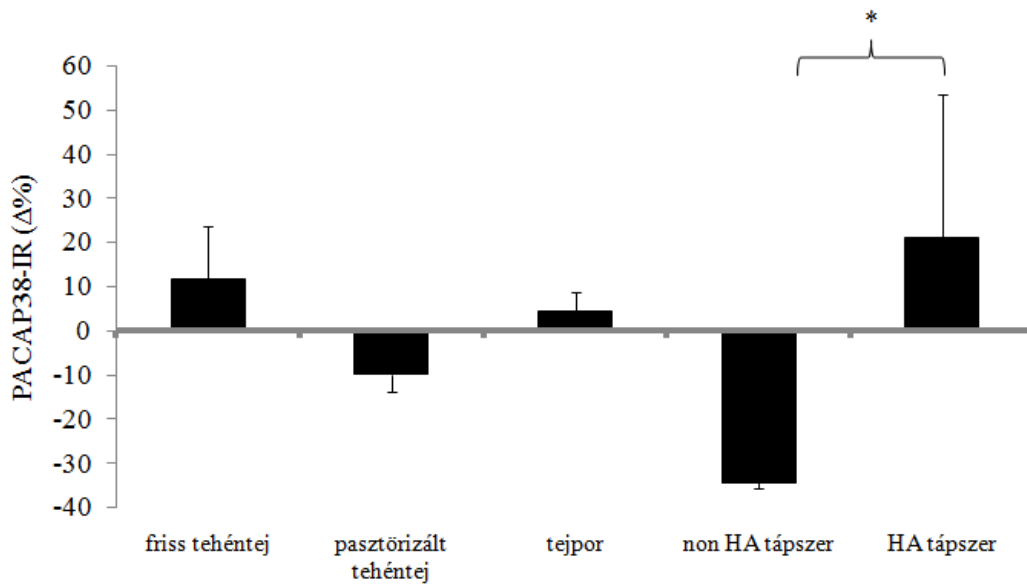
vizsgálati anyagokban ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Az elő- és utótej mintákban a PACAP38-IR nem mutatott különbséget (3. ábra).



3. ábra. A PACAP38-IR változása humán tejmintákban ($n_{\text{kolosztrum}} = 11$; $n_{\text{átmeneti tej}} = 8$; $n_{\text{előtej}} = 4$; $n_{\text{utótej}} = 4$; $n_{7-10} = 45$; $n_{11-13} = 27$; $n_{14-17} = 20$). Az „y” tengelyen az érett anyatejhez viszonyított PACAP38-IR változások vannak feltüntetve ($\Delta\% = \frac{(X - X_{\text{ref}})}{X_{\text{ref}}} \times 100$, ahol X = a vizsgált mintákban mért PACAP38-IR átlagértéke, X_{ref} = a referenciaként szolgáló érett, a szoptatás 1-6. hónapjában gyűjtött anyatejminták PACAP38-IR átlagértéke; az átlagértékektől való eltérések SEM-ben vannak kifejezve; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

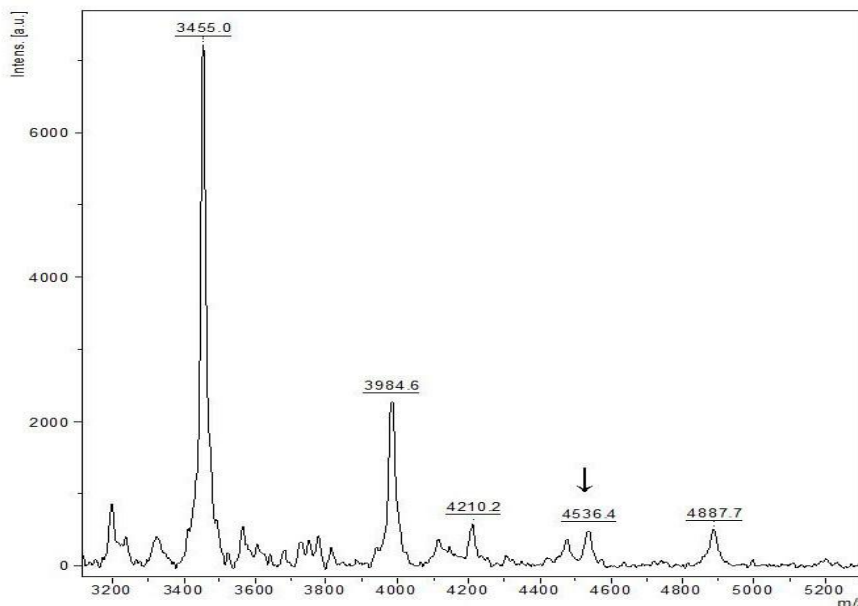
3.1.2. Friss tehéntej, pasztörizált tehéntej, tejjor és tápszerminták

Az érett anyatejhez hasonló PACAP38-IR volt detektálható a friss tehéntejben, valamint a kereskedelmi forgalomban kapható pasztörizált tehéntej és tejjor mintákban. Bár a pasztörizált tehéntej mintákban a PACAP38-IR csökkenő tendenciát mutatott, szignifikáns különbséget nem észleltünk az érett anyatejhez viszonyítva. Szignifikánsan alacsonyabb PACAP38-IR volt mérhető a nem hipoallergén tápszerekben, mint a hipoallergénekben és az érett anyatejben (4. ábra).



4. ábra. PACAP38-IR friss és pasztörizált tehéntejben, tejporokban, valamint tápszerekben ($n_{\text{friss tehéntej}} = 4$; $n_{\text{pasztörizált tehéntej}} = 4$; $n_{\text{tejpor}} = 4$; $n_{\text{non HA tápszer}} = 7$; $n_{\text{HA tápszer}} = 2$). Az eredmények feltüntetése a 3. ábrához hasonló (* $p < 0,05$).

A tömegspektrometriás mérés során a PACAP38 molekulatömegére jellemző csúcs megjelenése is bizonyította a peptid jelenlétét a tápszermintákban (5. ábra).



5. ábra. Hipoallergén tápszer MALDI TOF/TOF tömegspektruma. A 4536,4 Da-nál megfigyelhető csúcs a PACAP38 protonált kvázi molekulaionjának $[M+H]^+$ felel meg.

3.2. PAC1 receptor expresszió

3.2.1. Laktáló és nem laktáló emlőminták PAC1 receptor immunhisztokémiája

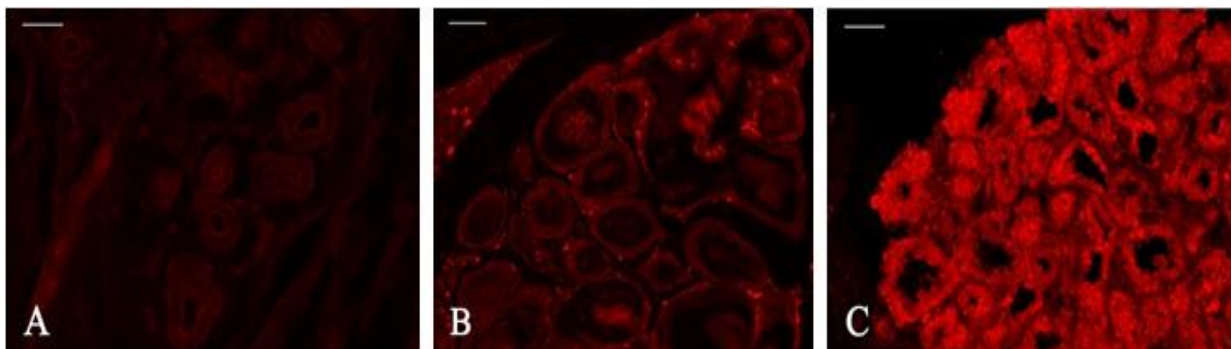
A nem laktáló humán és birka emlőminták gyenge PAC1 receptor jelölődést mutattak az emlőszövetek duktális és alveoláris hámjában. Ezzel szemben intenzív PAC1 receptor expresszió volt észlelhető a laktáló tőgybiopsziákban, így a szekretoros egység epitelsejtjeiben, főleg a sejtmembránoknak megfelelően és néhány esetben granuláris festődés formájában a citoplazmában. A kötőszövet nem jelölődött (6. ábra).

3.2.2. HC11, HMEC, MCF7 és MDA-MB-468 emlő sejtvonalak PAC1 receptor expressziója

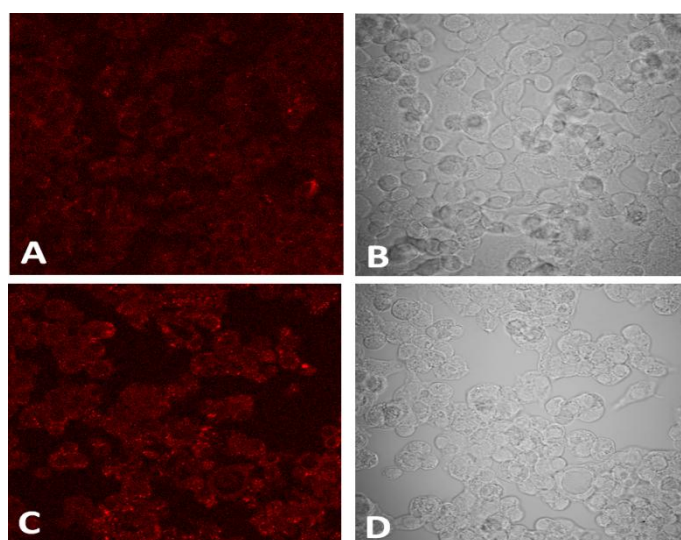
Konfokális mikroszkópos eredményeink bizonyították a PAC1 receptor jelenlétét az összes vizsgált sejtvonalon. Az egyes sejtvonalak azonban a jelölődés tekintetében eltérő intenzitást mutattak (7. és 8. ábra).

3.3. DIP indukálta differenciálódás vizsgálata HC11 sejttenyészetén

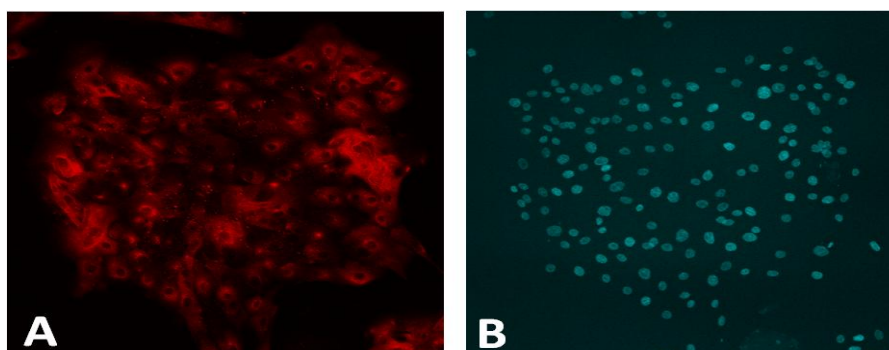
Kísérletünkben a PRL által indukált STAT5 és az inzulin által közvetített Akt/p38 MAPK foszforilációt, valamint a differenciálódásra jellemző β -kazein expresszió megjelenését vizsgáltuk. A PACAP kezelés önmagában, PRL nélkül nem indukált β -kazein expressziót és nem befolyásolta a DIP kezelés által kiváltott β -kazein expresszió mértékét (9. ábra).



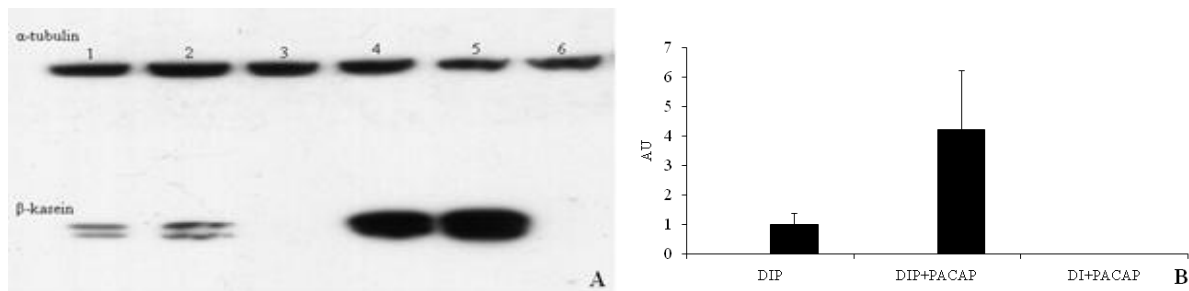
6. ábra. PAC1 receptor immunohisztokémia nem laktáló humán emlő (A) és birka (B), valamint laktáló birka tőgybiopsziából (C). A terminális lobuláris egységek egyaránt jelölődnek nem laktáló és laktáló szövetmintákban, de a jelölődés sokkal intenzívebb a birkából származó laktáló tőgybiopsziás mintában (poliklonális anti-PAC1 és Alexa Fluor „568” konjugált anti-nyúl IgG; aránymérték: 50 μ m).



7. ábra. HC11 sejtek (B22 klón) PAC1 receptorának immuncitokémiai vizsgálata konfokális (A, C) és fáziskontraszt (B, D) mikroszkóp alatt. A differenciálatlan (A, B) és differenciált (C, D) sejtek közel azonos intenzitású membránjelölődést mutatnak (poliklonális anti-PAC1 és Cy3-konjugált anti-nyúl IgG; 200x nagyítás).

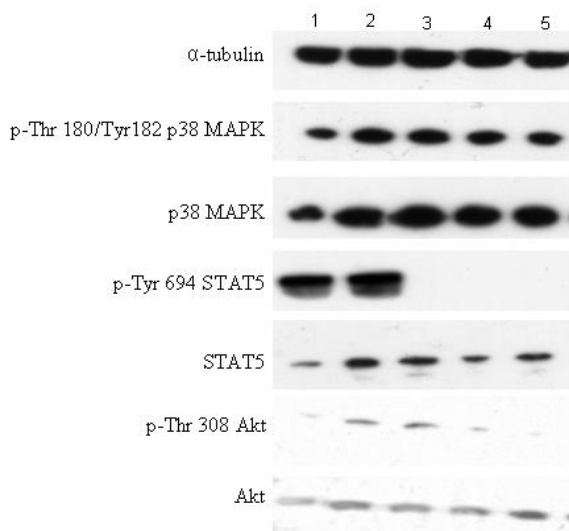


8. ábra. HMEC sejtek PAC1 receptorának immuncitokémiai vizsgálata. Összehasonlítva a 7. ábrán feltüntetett HC11 sejtek jelölődésével ezen a sejtvonalon a membránfestődés intenzitása szembetűnően magasabb (A), a vizsgált sejtek magjait Hoechst-jelöléssel tüntettük fel (B) (poliklonális anti-PAC1; 200x nagyítás).



9. ábra. HC11 egér emlősejtek differenciálódásának követése PACAP jelenlétében, illetve anélkül. **A:** Két különböző HC11-es klón Western blot analízise. A23 klón: 1. DIP; 2. DIP+PACAP; 3. DI+PACAP; B22 klón: 4. DIP, 5. DIP+PACAP; 6. DI+PACAP. Az α -tubulin belső, metodikai kontrollként szerepel a bloton. A DIP β -kazein expressziót indukál, amely az A23 klón esetében jól látszik az 1-es pozíciónak megfelelően a 32 és 29 kDa-os molekulatömegű kettős „band” formájában, amelyet az intracelluláris β -kazein különböző poszttranszlációs módosulásai okoznak. A B22 klón esetében a differenciáció effektívebb, így a kettős „band” nem látszik, hanem erős, összemósódott „band” mutatkozik a 29 kDa-nál (4-es pozíció). PACAP kezelés önmagában nem eredményez β -kazein expressziót („band” hiánya 3-as és 6-os pozícióban) és nem befolyásolja a DIP által kiváltott β -kazein expresszió mértékét sem (2-es és 5-ös pozíciók). **B:** A B22-es sejtklónon végzett vizsgálat denzitometriás analízise. A DIP+PACAP kezelés után a β -kazein „band” denzitása enyhén, de nem szignifikánsan emelkedik a csak DIP-pel kezelt mintákhoz képest. A DI+PACAP kezelés PRL hiányában nem eredményez mérhető denzitást a membránon. Az analízis három független mérésen alapul. Az adatok az y-tengelyen úgy vannak feltüntetve, hogy a DIP kezelést követően mért denzitás értéket egységnek tekintjük (AU = arbitrary unit; átlag \pm SEM).

A PACAP38-kezelés esetleges hatását nem tudtuk kimutatni a STAT5 és az Akt/p38 MAPK jelátviteli útvonalakon sem (10. ábra).



10. ábra. A differenciálódásban szerepet játszó p38 MAPK, STAT5 és Akt útvonalak Western blot analízise HC11 sejtliázátumból. 1. DIP; 2. DIP+PACAP; 3. DI+PACAP; 4. I+PACAP; 5. I. A p38 MAPK és az Akt foszforilált formája mérhető az összes kísérleti összeállításban és annak mértékét sem a PRL, sem a dexametazon, sem a PACAP kezelés nem befolyásolja, ezzel szemben a STAT5 fehérje foszforilációja csak PRL jelenlétében megfigyelhető meg (markáns STAT5 1-es és 2-es „band-ek”). A PACAP nem befolyásolja a STAT5 fehérje aktivációját, amelyet bizonyít az 1-es és 2-es STAT5 „band-ek” hasonlósága. PRL hiányában a PACAP nem képes aktiválni a STAT5 fehérjét (3-as és 5-ös STAT5 „band-ek” hiánya).

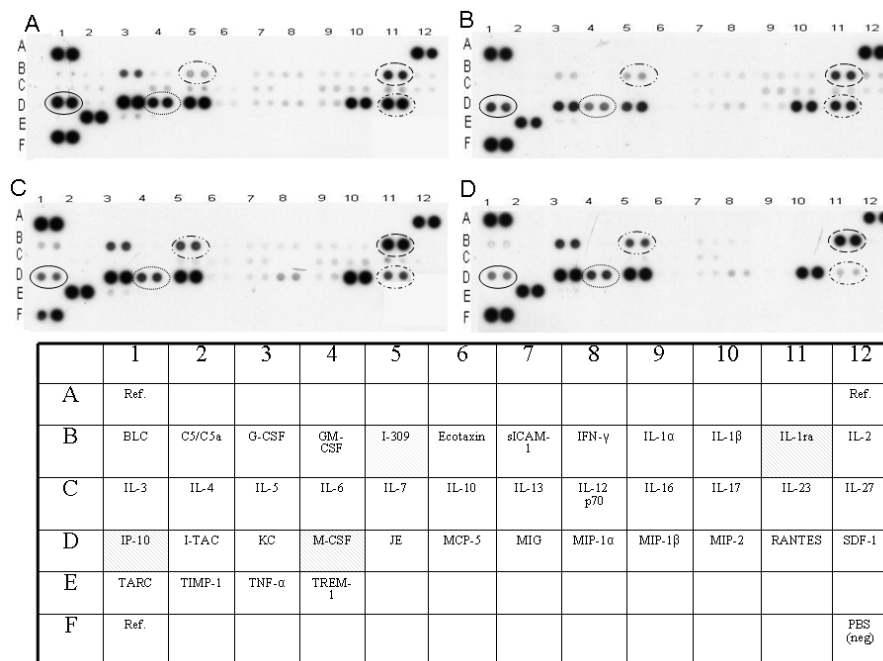
3.4. HC11 sejtek kemo- és citokin, valamint növekedési és angiogenikus faktor szekréciója DIP és PACAP-hatás alatt

3.4.1. Citokin array vizsgálatok

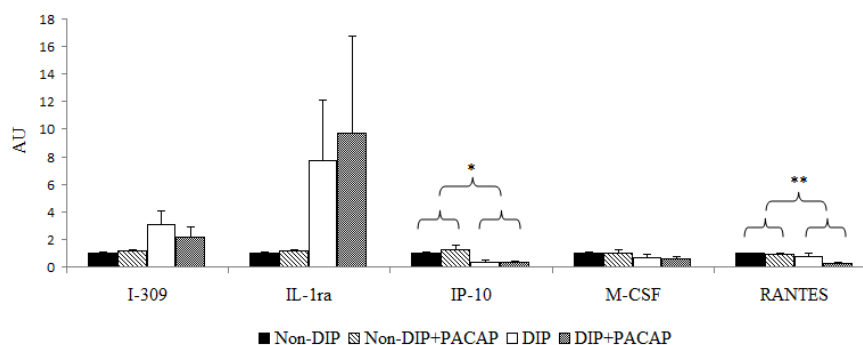
Kísérleteink azt mutatták, hogy a differenciált HC11 sejtek szignifikánsan alacsonyabb szinten szekretáltak az interferon gamma-induced protein (IP)-10 és regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES) kemokineket, mint a differenciálatlan sejtek.

További csökkenés volt tapasztalható a RANTES szekréciójában PACAP38-kezelést követően a differenciált sejteken, de ez a változás nem volt statisztikailag szignifikáns. A differenciált sejteken szemkontroll mellett emelkedett I-309 és interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) és csökkent macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) szekréció volt megfigyelhető PACAP38-kezelést követően, de ezek a változások sem bizonyultak a denzitometriás mérést követően szignifikánsnak.

Az IL-ok nagyon gyenge jelet adtak, így azokat nem elemeztük tovább (11. és 12. ábra).



11. ábra. Egér citokin array. **A:** differenciálatlan, kezeltlen HC11 sejtek; **B:** differenciálatlan PACAP kezelt sejtek; **C:** differenciált, DIP kezelt sejtek; **D:** differenciált, DIP+PACAP kezelt sejtek. A vizsgálati membránokon azon pontok vannak külön jelezve, melyeknek megfelelően az egyes fehérjék egyértelmű, szemmel látható változást mutatnak DIP és/vagy PACAP kezelést követően: B5 = I-309; B11 = IL-1ra; D1 = IP-10; D4 = M-CSF; D11 = RANTES.

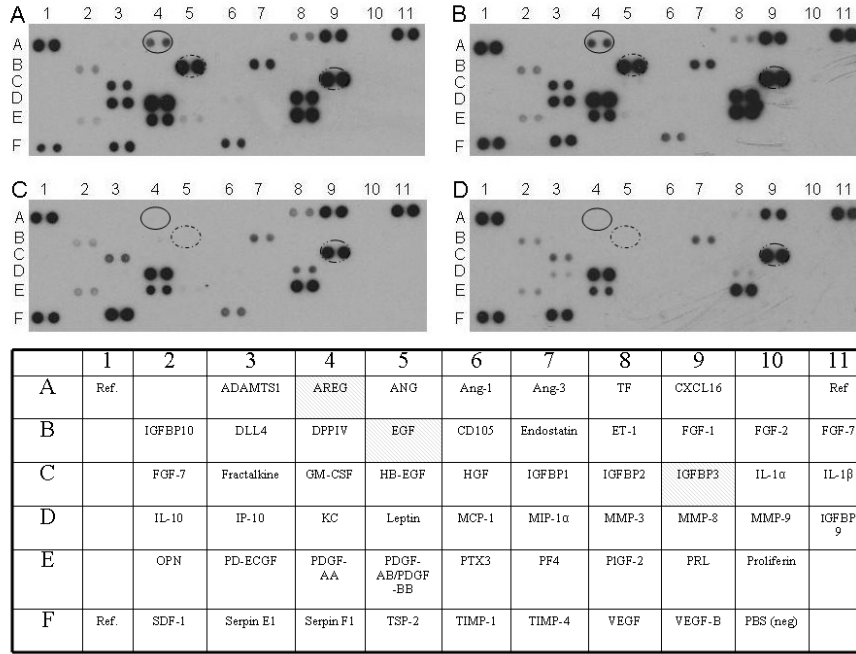


12. ábra. A szekretált citokinek változásainak denzitometriás analízise. Az „A membrán” referencia pontjainak (lásd 11. ábra A1, A12 és F1) átlag denzitás értékét egységnek tekintettük és ezzel hasonlítottuk össze a további membránokon (B, C és D) lévő hasonló referencia pontok denzitás értékeit, majd eszerint határoztuk meg a különböző kísérleti körülmények által indukált fehérje expresszió változásokat. A differenciált sejtek tenyészteteinek médiumában a szekretált IP-10 és RANTES expressziója szignifikánsan alacsonyabb, mint a differenciálatlanokéban (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$). A vizsgálat három független mérésen alapul (átlag \pm SEM).

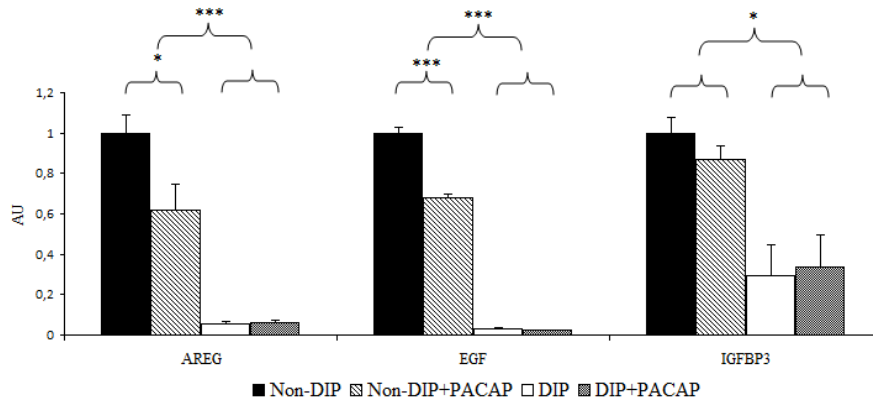
3.4.2. Angiogenesis array vizsgálatok

Vizsgálataink kapcsán azt tapasztaltuk, hogy differenciáció során az amphiregulin (AREG), EGF és insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 szekréciója szignifikánsan csökkent. Egyéb IGFBP-k, így az IGFBP1, 2 és 9 nem eredményezett értékelhető jelet. Az IGFBP10 jól detektálható volt, de változást nem mutatott.

A PACAP38 kezelés szignifikánsan csökkentette az EGF és AREG szekrécióját a differenciálatlan sejteken, ez a csökkenés azonban nem volt megfigyelhető a differenciált sejtek esetében. Sem a hepatocyte growth factor (HGF), sem az egyéb klasszikus angiogenikus faktorok, mint a vascular endothelial growth factor (VEGF), a fibroblast growth factor (FGF)-2, az angiopoetin, a thrombospondin és a platelet-derived growth factor (PDGF)-AA nem adtak denzitometriás elemzésre alkalmas jelet. Az egyéb vizsgált fehérjék expressziója is gyenge, elemzésre alkalmatlan volt (13. és 14. ábra).



13. ábra. Egér angiogenezis array. **A:** differenciálatlan, kezeletlen HC11 sejtek; **B:** differenciálatlan PACAP kezelt sejtek; **C:** differenciált, DIP kezelt sejtek; **D:** differenciált, DIP+PACAP kezelt sejtek. Hasonlóan a korábbiakhoz azon fehérjéknek megfelelő pontok vannak a vizsgálati membránokon külön jelezve, melyek egyértelmű változást mutatnak szemkontroll mellett DIP és/vagy PACAP kezelést követően: A4 = AREG; B5 = EGF; C9 = IGFBP3.



14. ábra. A szekretált AREG, EGF és IGFBP3 denzitometriás analízise. A differenciáció (DIP kezelés) mind a három faktor szekrécióját szignifikánsan csökkenti. A differenciálatlan sejtek médiumaiban PACAP kezelést követően szignifikánsan kevesebb AREG és EGF detektálható (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). A vizsgálatot háromszor ismételtük, az eredményeket a 12. ábrán részletezetteknek megfelelően hasonlítottuk össze.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. A PACAP38-IR változása a szoptatási időszak alatt

4.1.1. PACAP38-IR a kolosztrumban

A kolosztrum magasabb koncentrációban tartalmaz immunglobulinokat, növekedési faktorokat, citokineket, oligoszacharidokat, antimikrobiális és immunszabályozó faktorokat, mint az átmeneti és az érett tej (Kelly és mtsai 2003; Yoshioka és mtsai 2005). Vizsgálatainkban a PACAP38, hasonlóan a bevezetőben említett motilinhez, gastrinhoz, leptinhez, valamint β -kazomorfin-5 és 7-hez, szignifikánsan magasabb koncentrációban volt jelen a kolosztrumban, mint az érett tejben. A kolosztrumra vonatkozó mérési eredmények alapján arra lehet gondolni, hogy egyes fehérjék nem csak közvetlenül az újszülött bélrendszerének, de felszívódva és a keringésbe jutva, egyéb szerveinek megfelelő fejlődéséhez is elengedhetetlenek (Lu és mtsai 1995; Jarmołowska és mtsai 2007; Eilers és mtsai 2011).

4.1.2. A PACAP38-IR változása a szoptatás 1-17. hónapjában

A kizárólagos anyatejes táplálás szakaszában (1-6 hónap) a PACAP38-IR értéke állandónak mutatkozott. A 10. hónapot követően azonban szignifikáns emelkedés volt észlelhető. Az általunk észleltékhez hasonló koncentráció-emelkedést figyelték meg a PTHrP vonatkozásában patkány és tehéntejben, amely csak az ivadékok elválasztásakor csökkent le (Law és mtsai 1991; Yamamoto és mtsai 1992). Ezzel ellentétben más hormonok és növekedési faktorok, így például a PRL és az EGF, koncentrációja csökken a szoptatás előrehaladtával, a CGRP szintje azonban változatlan (McMurtry és Malven 1974; Shah és mtsai 1989).

A szoptatás előrehaladtával a tejhozam egyre csökken, az összfehérje azonban viszonylagosan állandó (Hartmann és Kulski 1978; Lönnerdal 2003). A 10. hónapot követő PACAP38-IR emelkedés így akkumulációra utal, amely fokozott PACAP termelésre enged következtetni.

4.1.3. PACAP38-IR az elő- és utótejben

Az anyatej összetétele egy szoptatás során is változik. Az előtej alacsony zsírtartalmú, az utótej krémes, zsírban gazdag. Az előtej a csecsemő szomját oltja, melyet tápanyagban dús

utótej vált fel (Rings és mtsai 1994; Lawlor-Smith és Lawlor-Smith 1998). Nem megfelelő szoptatási technika („mellváltás”) az elő- és az utótej mennyiségének aránytalansághoz vezet („foremilk/hindmilk imbalance”). Az előtej laktóz tartalma magasabb, így túl gyakori „mellváltás” esetén az újszülött több előtejet szopik, és a lebontatlan tejcukortöbblet laktozémiához hasonló hasmenéses tüneteket okoz (Lawlor-Smith és Lawlor-Smith 1998).

Az elő- és utótej összetételének megváltozása az újszülöttek számára szignált jelent a szopás befejezésére. A táplálékfelvételt szabályozó két legfontosabb peptid közül az egyik a ghrelin, amely fokozza az étvágyat, a másik a leptin, amely csökkenti a táplálékfelvételt (Klok és mtsai 2007). Az étvágyat gerjesztő hatású, orexigén ghrelin szintje szignifikánsan alacsonyabb az utótejben, mint az anorexigén leptiné és ez a szopás befejezését idézheti elő (Karatas és mtsai 2011).

A PACAP is befolyással bír a táplálékfelvétel szabályozására. Aranyhalakban intracerebroventrikuláris és intraperitoneális PACAP adagolást követően a táplálékfelvétel egyaránt csökkent (Matsuda és mtsai 2006). A PACAP KO egerek szénhidrát felvétele is csökkent, és korai posztnatális halálozásukat károsodott szénhidrát anyagcseréjükkel hozzák összefüggésbe (Gray és mtsai 2001). A PACAP anorexigén hatását az α -melanocyte-stimulating hormone (MSH) és CRH idegi útvonalak gátlásán keresztül fejti ki (Matsuda és Maruyama 2007). Kísérleteink során nem észleltünk az említett fehérjékhez hasonló különbséget az elő- és utótej PACAP szintjei között, így az anyatejben lévő PACAP feltehetően nem játszik szerepet az újszülöttek és csecsemők táplálékfelvételének szabályozásában.

4.2. A PACAP a tehéntejben, tejporokban és tápszerekben

Az anyatej biztosítja a csecsemő számára a megfelelő tápanyag ellátást és a kórokozókkal szembeni védekező mechanizmusok kialakulását, ezért az anya- és tehéntej, valamint a kereskedelmi forgalomban kapható tápszerek összetételének vizsgálata nagy népegészségügyi jelentőséggel bír.

4.2.1. A tehéntej összetétele és feldolgozása. PACAP38-IR a tehéntejben

Amennyiben az anyatejes szoptatás valamilyen ok folytán gátolt a csecsemő megfelelő tápanyagellátását tehéntej alapú készítményekkel helyettesítik. Az emberi és a tehéntej közötti alapvető különbség az, hogy a tehéntej több proteint tartalmaz, valamint a kazeinek és az

egyéb tejsavó fehérjék aránya eltérő (82:18, ill. 40:60). Ez az újszülött veséje számára fokozott fehérjeterhelést és magasabb, rosszul emésztett proteinfelvételt jelent. Az esszenciális zsírsavak koncentrációja ugyanakkor a tehéntejben alacsonyabb, mint a humán tejben (Sabbadin és mtsai 1999).

Számos ipari eljárást dolgoztak ki azért, hogy a tehéntej összetételét az anyatejéhez hasonlóvá tegyék és a csecsemők számára a lehetőségek szerinti legjobb minőségű tápszereket biztosítsák. Még ilyen körülmények között is jóval kevesebb, a csecsemők fejlődése szempontjából fontos faktor található a tápszerekben, mint az anyatejben (Wells 1996). A gyártás folyamán alkalmazott eljárások célja, hogy a kereskedelmi tejek emberi fogyasztásra alkalmas, mikroorganizmus mentes, de tápanyagban gazdagok maradjanak. A pasztörizálás során a mikroorganizmusoknak csaknem 99 %-át elpusztítják, a fennmaradók pedig már nem fertőznek. Ezzel szemben sterilizáláskor nem marad baktérium a tejben, minősége azonban romlik. Az angol rövidítése alapján UHT pasztörizálásnak nevezett eljárás során 0,1-2 másodpercen át 100 °C feletti hőmérsékletre melegítik a tejet, majd visszahűtik (Wilson 1943).

Kísérleteink során hasonló PACAP38-IR mértünk az UHT tejekben, mint az érett anyatejben és kezeletlen tehéntejben. Érdekes megfigyelés, hogy a pasztörizált tehéntej fogyasztás mellett az atópiás alkatú gyermekek előfordulási gyakorisága csökkent, és egyéb neuropeptidok (CGRP, NPY, VIP) mellett, a PACAP is képes csökkenteni az atópiás dermatitiszes betegek tüneteit (Perkin 2006; Mikami és mtsai 2012). Így elképzelhető, hogy nem csak a pasztörizált tehéntej mikrobiális összetételének változása, a zsírsavak és citokinek mennyiségének és minőségének különbsége, valamint a pasztörizálás kapcsán csökkent allergén epitópok mennyisége (Peroni és mtsai 2009), hanem a pasztörizált tejben megőrzött PACAP is segítheti az atópiás alkat kialakulása elleni védelmet.

4.2.2. Tejporok és tápszerek gyártási folyamata. PACAP38-IR tejporokban és tápszerekben

A tejpor- és tápszergyártás során az előkészített tehéntejből a víztartalom teljes, vagy részleges elvonásával, hőkezeléssel porszemű tejterméket kapnak. A porlasztás és hőkezelés alatt a tehéntej tápanyag- és vitamintartalmának egy része elveszik. Az elvesztett ásványi anyagok, vitaminok és rostok nagy részét pótolják. A HA tápszerek mentesek a nagy tejfehérjéktől, ugyanis azokat extenzív hidrolízissel lebontják, így az allergiás reakciók száma minimalizálódik (Chiancone és mtsai 1995; Wells 1996).

Tömegspektrometriával bizonyítottuk a PACAP jelenlétét a tápszermintákban. A tejporokban és a HA tápszerekben a PACAP38-IR lényegében változatlan aktivitással detektálható, ezzel szemben a PACAP38-IR szignifikánsan alacsonyabb volt a nem HA tápszerekben, mint HA típusú társaikban. Mivel a tápszergyártási folyamatok során csak a 6000 Da feletti proteinek hasítódnak (Xiao 2002), ezért a PACAP a maga 4535 Da-os molekulatömegével képes lehet ellenállni ezeknek a folyamatoknak, így azonosítható lehet a tápszermintákban.

A HA és nem HA tápszerek közötti eltérő PACAP38-IR esetleg annak tulajdonítható, hogy a nem HA tápszerek esetében a szállítófehérjéhez kötött PACAP-hoz az antitest a RIA mérésben nem megfelelően fér hozzá, azaz a méréssel a fehérjéhez kötött PACAP nem, vagy csak kisebb mértékben detektálható. Ezzel szemben extenzív hidrolízist követően a HA típusú tápszerek viszonylag magas koncentrációban tartalmazhatnak RIA-val kimutatható PACAP-ot.

A plazmában meglehetősen gyorsan lebomló PACAP érdekes módon a tejben és tej alapú készítményekben viszonylag stabil. Az anyatej szerinproteázokban (α 1-antitripszin és antikimotripszin) gazdag. Az inhibitorok koncentrációja a laktáció kezdetekor a legmagasabb és az idő előrehaladtával csökken. Következésképpen számos élettanilag fontos, szekretált peptid koncentrációja magas marad az anyatejben a szoptatás első hónapjaiban (Chowanadisai és Lönnerdal 2002). A proteáz inhibitorok protektív hatása magyarázhatja az egyébként rövid életű PACAP detektálhatóságát a tejben és a tejtartalmú készítményekben.

A plazmában a PACAP38 szelektíven kötődik a cöruoplazminhoz, de a szállító fehérjéje az anyatejben nem ismert (Tams és mtsai 1999). A cöruoplazmin és a laktoferrin az anyatejben komplexet képez. A PACAP képes a laktoferrint leszorítani a cöruoplazminról, alapot adva arra a feltételezésre, hogy a PACAP szállító fehérjéje az anyatejben is a cöruoplazmin (Sokolov és mtsai 2006).

4.3. Az anyatejben jelen levő PACAP eredete

Az anyatejben kimutatható hormonok, növekedési faktorok és peptidek csoportosíthatóak az anyatej/plazma koncentrációjuk alapján. Az ösztrogén, a GnRH, a thyrotropin-releasing hormone (TRH), a VIP, a somatostatin (SOM), a GHRH, a bombesin, a neurotensin, az oxytocin, a PTHrP, a PRL, az inzulin, a relaxin, az IGF-1, az IGF-2, az EGF, a TGF, a GH és

a proszttaglandin koncentrációja magasabb az anyatejben, mint a plazmában. A felsoroltakhoz hasonlóan a PACAP38 is 5-20-szor magasabb koncentrációban van jelen az anyatejben, mint a hozzá tartozó plazmamintákban (Börzsei és mtsai 2009). Ezzel szemben a glükokortikoidok, az androgének, a progeszteron, a TSH, a GIP, a gastrin, a cholecystokinin (CCK), a PHM és a peptid YY koncentrációja azonos, vagy alacsonyabb a tejben, mint a plazmában (Grosvenor és mtsai 1993).

Az anyatejben azonosítható faktorok közül egyesek aktivitás és strukturális változás nélkül szűrődnek át a plazmából az anyatejbe (VIP, TRH, SOM), míg mások glikoziláción, foszforiláción és proteolízisen esnek át. Egyes hormonok, növekedési faktorok és bioaktív anyagok nem csak a véráramból kerülhetnek a tejbe, hanem közvetlenül az emlőmirigyben is szintetizálódnak (PTHrP, GnRH, PRL, IGF, EGF, laktoferrin, transferrin és kazomorfin) (Grosvenor és mtsai 1993).

A neuropeptidek közül a galanin, a SOM, a VIP, a TRH, a GHRH, a CCK, a neurotensin, az oxytocin és a relaxin expresszióját vizsgálták normál, vemhes, laktáló és posztlaktáló patkány emlőben RT-PCR-rel. A SOM kivételével azonban egyetlen peptid RNS-e sem volt kimutatható az emlő különböző fejlődési stádiumaiban. Ebből arra lehet következtetni, hogy a neuropeptidek többsége a keringésből aktívan koncentrálik a tejbe (Chen és mtsai 1999).

Munkacsoportunk nem közölt vizsgálatai szerint 3 napos laktációs periódusban lévő többcsöcsű egerek („natal multimammate mouse”) emlőjének PCR vizsgálata azt mutatja, hogy sem a 288bp, sem pedig a 247bp PACAP mRNS nem található meg a mintákban. Eszerint a PACAP, hasonlóan a VIP-hez, nem az emlőben szintetizálódik, hanem a plazmából származhat.

4.4. A tejben kimutatott PACAP feltételezhető élettani hatásai

Az anyatejből az újszülöttek és csecsemők keringésébe átjutó PACAP mennyisége nem ismert. A proteáz inhibitorok koncentrációja, mint azt korábban már jeleztük, a laktáció korai időszakában a legmagasabb az anyatejben, és ennek szerepe lehet abban, hogy a PACAP nem degradálódik és aktivitása megőrződik (Chowanadisai és Lönnerdal 2002).

Az újszülöttek és a csecsemők alacsonyabb mértékben szekretálnak sósavat, így gyomor pH-juk magas. A felnőttekhez viszonyítva pankreász enzimaktivitásuk alacsonyabb

és emésztetlen tápanyagokra nézve bélrendszerük permeabilitása fokozott. A kolosztrális proteinek felszívódása újszülöttekben transzport vakuolák által mediált, nem szelektív folyamat (Weaver 1992; Chohanadisai és Lönnerdal 2002; Baintner 2007; Jarmołowska és mtsai 2007). Mindezek elősegíthetik a PACAP és a gasztrointesztinális mukóza kontaktusát és ezen keresztül a PACAP felszívódását, így lehetővé tehetik fiziológias hatásainak kifejtését.

Feltételezhető, hogy az anyatejben jelenlévő PACAP szerepet játszhat az újszülöttek idegrendszerének fejlődésében, fontos immunmoduláló funkciója lehet a korai posztnatális fejlődés során, valamint befolyásolhatja újszülött PRL termelését.

4.4.1. A PACAP és az idegrendszer korai fejlődése

A PACAP neurotrófikus hatását számos *in vitro* kísérletben vizsgálták, ezek részletezése azonban meghaladja a dolgozat kereteit, összefoglaló ismertetésük magyar nyelven Reglődi MTA doktori értekezésében hozzáférhető (Reglődi 2009). A bevezetőben néhány kísérleti adatot kiemelve említés történt a PACAP neurális differenciációt előidéző hatásairól. Ezek mellett a PACAP különböző típusú idegsejteken befolyásolja a neuritnövekedést, a migrációt, a mitózist és a sejtek proliferációját. Szerepet játszik továbbá a velőcső dorzális-ventrális mintázatának kialakításában, a fejlődő retina dopaminerg fenotípusának és az agykéreg lamináris helyzetének meghatározásában (Reglődi 2009).

Ezzel szemben sokkal kevesebb *in vivo* adattal rendelkezünk a PACAP fejlődéstani hatásairól. Az *in vivo* PACAP kezelés átmenetileg emeli a kisagy stratum granulosum internum és a stratum moleculare granuláris sejteinek számát, azonban a Purkinje sejtekre nincs hatása (Vaudry és mtsai 1999; Vaudry és mtsai 2000a). A peptid subarahnoidális térbe történő adagolása növeli a kisagy kérgi állományát. PACAP és PACAP antagonist (PACAP6-38) együttes adagolása mellett ezek a változások nem jönnek létre (Waschek 2002).

Különös figyelmet érdemelnek a PACAP KO egerek idegrendszeri fejlődésére vonatkozó vizsgálatok. A PACAP és receptora már a korai embrionális szakaszban megjelenik, maximumát a posztnatális 4. és 12. nap között éri el, amely párhuzamosságot mutat a kisagy granuláris rétegeinek neurogenesisével (Altman 1972; Sheward és mtsai 1998; Allais és mtsai 2007). A 4 és 7 napos PACAP KO és vad típusú egerek kisagyának általános szerkezete nem mutat eltérést, azonban a külső szemcsés réteg szignifikánsan vékonyabb és a

szemcsesejtek száma alacsonyabb a PACAP KO egerekben. RT-PCR vizsgálatok bizonyították, hogy a nesztin (neurális prekursor marker) mRNS szint szignifikánsan nő a PACAP KO egerek esetében, egyidejűleg a szinaptofizin (érett neurális marker) szintje csökken. Fehérje szinten a nesztin azonos expressziós mintát mutat a KO és vad típusú egerekben. A szinaptofizin szint a 4. posztnatális napon a vad típusú egerekben mért szinthez képest még alacsony, ez a különbség azonban a 7. posztnatális napra eltűnik (Allais és mtsai 2007). PACAP KO egerekben a mielinizáció hamarabb megkezdődik, mint a vad típusú egerekben és a mielinizált rostok magasabb denzitásban vannak jelen. Az eredmények azt sugallják, hogy az endogén PACAP gátolja a mielinizációt, időt hagyva az axon és a szinapszis formálódásra és fejlődésre (Vincze és mtsai 2011). A felsoroltakból arra lehet következtetni, hogy a PACAP befolyással bír az idegfejlődés korai szakaszára.

4.4.2. A PACAP mint immunmodulátor

Az anyatejben megtalálható PACAP fontos szerepet tölthet be az újszülött bélimmunitásának kialakításában és direkt hatást fejthet ki a bélflórára.

Az immunválasz és az antigén „clearance” a CD4⁺ T-sejtek differenciációjától függő folyamat. A PACAP mRNS és fehérje szinten egyaránt csökkenti a proinflammatorikus és növeli az antiinflammatorikus citokinek és kemokinek expresszióját, és ezen keresztül *in vitro* és *in vivo* is serkenti a Th2 típusú (antiinflammatorikus) és gátolja a Th1 típusú (proinflammatorikus) választ. Az irodalomban a peptidet ezért a hatásáért „makrofág deaktivátor faktornak és endogén immunmoduláló molekulának” is nevezik. Ezenfelül a CD4⁺ és CD8⁺ timocitákra kifejtett antiapoptotikus hatásával is szabályozza a T-sejtek érését. A PACAP modulálja a kemokinek termelődését, így befolyásolja a polimorfonukleáris sejtek, makrofágok és limfociták „recruitment”-jét és gátolja a neutrofilek kemotaxisát (Delgado és mtsai 1999; Delgado és Ganea 2000; Ganea és Delgado 2003; Vaudry és mtsai 2009).

Az anyatejben lévő antimikrobiális peptidek az első vonalú védelmi rendszert biztosítják az újszülött számára a baktériumok, a vírusok és a gombák ellen. Szerkezetükre jellemző az α -helix struktúra. Hidrofób tulajdonságuknak köszönhetően a sejtmembránhoz kapcsolódva képesek azt szelektíven roncsolni. Ilyen antimikrobiális peptidek a defenzin, a katelicidin, a protegrin, a lizozim, a kollektin és a laktoferrin (Reddy és mtsai 2004; Jensen és Hancock 2009). A PACAP is a fentiekhez hasonló amfipatikus karakterű, α -helix struktúrával rendelkező peptid, amely a sejtmembránon áthatolva képes annak integritását megbontani, a citoszólban felhalmozódva pedig autofágia és apoptózis-szerű programozott

sejthalál révén a paraziták pusztulását idézheti elő (Gonzalez-Rey és mtsai 2006; Doan és mtsai 2012 a, b). Kemorepellens és lizozim receptor agonista hatását is igazolták (Mace és mtsai 2000). Az anyatejben lévő PACAP a felsorolt mechanizmusok segítségével közvetlen védelmet nyújthat az enterális patogénekekkel szemben.

4.4.3. A PACAP és a PRL szekréció

A laktotróp sejtek PRL szekréciója a nucleus arcuatus sejtjei által termelt dopamin állandó tónusos gátlása alatt áll. Specifikus „releasing” hormonja nem ismert. A TRH és a portális vérben keringő ösztrogén, prosztaglandin F₂α, VIP és VIP-szerű peptidok képesek fokozni a PRL szekréciót (Gautvik és Kriz 1976; Fonyó 2006).

Miyata és mtsai már a PACAP felfedezéséről beszámoló közleményükben is említést tesznek arról, hogy a peptidnek a PRL szekréciójára stimuláló hatása van (Miyata és mtsai 1989). Az intravénásan adott PACAP emberben és patkányban emeli a PRL szintet. Laktáló patkányok agykamrájába juttatva szintén növeli, ezzel ellentétben prosztaglandin szinkronizált ösztrusz ciklusú juhokban hasonló alkalmazást követően és ovariectomizált juhokban a nucleus arcuatus-on keresztül csökkenti a PRL szintet (Arbogast és Voogt 1994; Sawangjaroen és Curlewis 1994; Anderson és mtsai 1996; Chiodera és mtsai 1996; Huang és Pan 1996; Tohei és mtsai 2001). A PACAP ellentétes *in vitro* és *in vivo* hatásait a kísérleti állatok faji különbözőségei és eltérő élettani helyzete magyarázhatja (Vaudry és Arimura 2003).

Bizonyítást nyert az is, hogy a PACAP képes növelni saját, PAC1 receptorának expresszióját és ezen keresztül potenciózni a TRH által indukált PRL szekréciót (Mijiddorj és mtsai 2011). Ezekkel az adatokkal összhangban van az a megfigyelés, miszerint PACAP KO állatok esetében a PRL-szint alacsonyabb (Isaac és Sherwood 2008). Újszülött patkányokban a PRL szekréció szoptatással közvetített anyai szignált igényel. Az anyatejből felszívódó és az ivadékok keringésébe kerülő faktorok eredményezik a PRL szekretáló sejtek megjelenését. Erre utalnak Porternek és Frawleynek hypophysis elülső lebenyből származó sejt kultúrán végzett kísérletei, melyek során az anyatej vizes oldatának a PRL és GH szekrécióra kifejtett hatását vizsgálták. A korai időpontban fejt tejek (2-4. napok) a későbbi időpontokban (15-16. napok) gyűjtött tejmintákhoz képest szignifikánsan növelték a PRL szekretáló, differenciált sejtek számát. A nevezett kutatók kromatográfiás vizsgálatokkal bizonyították, hogy ezt a hatást egy az anyatejben megtalálható 2000-6000 Da méretű peptid okozza (Porter és Frawley 1991). Figyelemre méltó, hogy a PACAP molekulatömege is ebbe

a tartományba esik, így feltételezhető, hogy az előbb említett hatások háttérében akár a PACAP is állhat.

4.5. A PAC1 receptor jelenléte az emlőhámsejteken

4.5.1. Immuncitokémiai vizsgálatok sejttenyészeteken

Berthon és mtsai, a VPAC1-2 és PAC1 receptorok izolálását megelőzően, vizsgálták különböző VIP-szerű peptidek hatását a HMEC és a HC11 sejtekre. A peptidcsalád tagjai a következő sorrendben emelték a cAMP szintet: VIP > PACAP38 > helodermin > PHI > PHM > peptide histidine valine (PHV) > helospektin > GHRH > szekretin. A cAMP emelkedés farmakológiailag aktív receptor jelenlétét feltételezte a sejteken (Berthon és mtsai 1992).

A PACAP receptorok felfedezését követően MCF-7 sejteken PCR technikával azonosították a VPAC1 és PAC1 receptorok mRNS-ét, a VPAC2 receptor mRNS-e azonban nem volt detektálható a sejteken. Az eredményeket Western blot módszerrel is alátámasztották, amely szerint a PAC1 receptor fehérjéje 60 kDa-nál volt kimutatható (Leyton és mtsai 1999).

Mikroszkópos vizsgálatainkkal ugyanezekben a sejtvonalakon közvetlenül demonstráltuk a PAC1 jelenlétét, és hasonló jelölődést láttunk az MDA-MB-468 sejteken is.

4.5.2. Normál és laktáló emlőből származó minták szövettani vizsgálatai

Humán biopsziás anyagokon PCR, Western blot és immunhisztokémiával is kimutatták a PACAP receptorok expresszióját. A normál emlőben a VPAC1 és a VPAC2 főként a dukális és glanduláris epitélisejteken expresszálódik, a strómális kötőszövet negatív. Hasonló eloszlás, de gyengébb intenzitás figyelhető meg a PAC1 receptor esetében (Leyton és mtsai 1999; Garcia-Fernandez és mtsai 2005).

Saját vizsgálatainkban a nem laktáló emlőkben gyenge PAC1 receptor expresszió és kötőszöveti negativitás mutatkozott, a laktáló emlőkben pedig a PAC1 expresszió emelkedését észleltük. Laktáló emlőből származó humán minták kísérletes vizsgálatok számára nem hozzáférhetők, ezért választottuk az összehasonlítás céljából birkák emlőszövetét.

4.5.3. Daganatos emlősejtek és szövetek VPAC1-2 és PAC1 receptorai

A tumoros mintákon (duktális és lobuláris karcinómák) mindhárom receptor intenzitása erősebb, mint az egészséges emlőjáratok hámsejtjein. A PAC1, illetve VPAC1 és VPAC2 stimulálását követően az adenilát-cikláz aktivitása dóziszfüggően változik, és ez arra enged következtetni, hogy a normál és a tumoros emlősejtek PACAP receptorai funkcionálisan aktív állapotban vannak és szerepük lehet az emlő élettani és patológiás folyamatainak szabályozásában (Garcia-Fernandez és mtsai 2005).

A PACAP receptoraival való kapcsolódás révén serkentheti egyes emlőtumrok proliferációját. A PAC1 receptor antagonistá, PACAP6-38 proliferációt gátló hatása bizonyított, így az MCF-7 sejteken csökkenti az *in vitro* kolóniák számát, *in vivo* pedig a tumor-xenograft indukálta daganatképződést (Leyton és mtsai 1999).

Reubi és mtsai *in vitro* receptor autoradiográfiás vizsgálatai szerint a metasztatikus axilláris nyirokcsomók kétszer akkora denzitásban mutatják a VPAC1 receptort, mint a primér emlőtumrok (Reubi és mtsai 2000). Ezek a megfigyelések lehetőséget nyújthatnak PACAP/VIP radioligandok kifejlesztésére (Schulz és mtsai 2004). A fentiek alapján az sem meglepő, hogy a VIP hibridek, mint VPAC antagonisták, képesek potenciózni a kemoterápiás szerek hatását (Zia és mtsai 1996; Moody és mtsai 2001). Az eredmények az emlődaganatok diagnosztikájában és terápiájában egyaránt felhasználhatók lehetnek.

4.6. A HC11-es egér emlősejtek laktogén differenciációja

4.6.1. A HC11 sejtvonal eredete és felhasználása laktogén differenciálódási modellekben (szilimarin, leptin, inzulin, IGF)

A HC11 sejtvonalat középidős vemhes BALB/c egerekből izolálták (Ball és mtsai 1988). A sejtvonal alkalmas az emlő laktogén differenciálódásának *in vitro* vizsgálatára. A konfluens HC11 sejtek laktogén hormonok hatására tejfehérjéket termelnek, melyek közül egyebek mellett a β -kazein expressziójának kimutatásával igazolható a differenciálódás megtörténte (Doppler és mtsai 1989).

A HC11-es sejtvonalon vizsgálták a szilimarin befolyását a laktogén differenciálódásra. A szilimarin egy hepatoprotektív flavonoid, amelynek antioxidáns, sejtmembrán stabilizáló, permeabilitás szabályzó, regeneráció-stimuláló és cirrózis ellenes

hatása van. Tehenek esetében növeli a tejhozamot és csökkenti az ellést követő fertőzések előfordulását. HC11 sejteken a szilimarin önmagában is szignifikánsan, és PRL jelenlétében még inkább, közel négyszeresére emeli a β -kazein mRNS szintet, azonban a STAT5 aktivációját nem befolyásolja (Starvaggi Cucuzza és mtsai 2010).

Arra a tényre alapozva, hogy a leptin megtalálható az anyatejben, vizsgálták hatását a HC11 sejtek β -kazein expressziójára. A leptin PRL és inzulin hiányában is képes potenciózni a β -kazein promoter aktivációját. Inzulin-helyettesítő képességét a hormon hipoglikémiás, perifériás inzulin szenzitivitást emelő tulajdonságával magyarázzák. A PRL szubsztitúciót pedig annak tulajdonítják, hogy a leptin receptor, a PRL receptorhoz hasonlóan, a citokin receptor családba tartozik, így a leptin és a PRL azonos intracelluláris jelátviteli utat (JAK/STAT5) aktivál (Baratta és mtsai 2003).

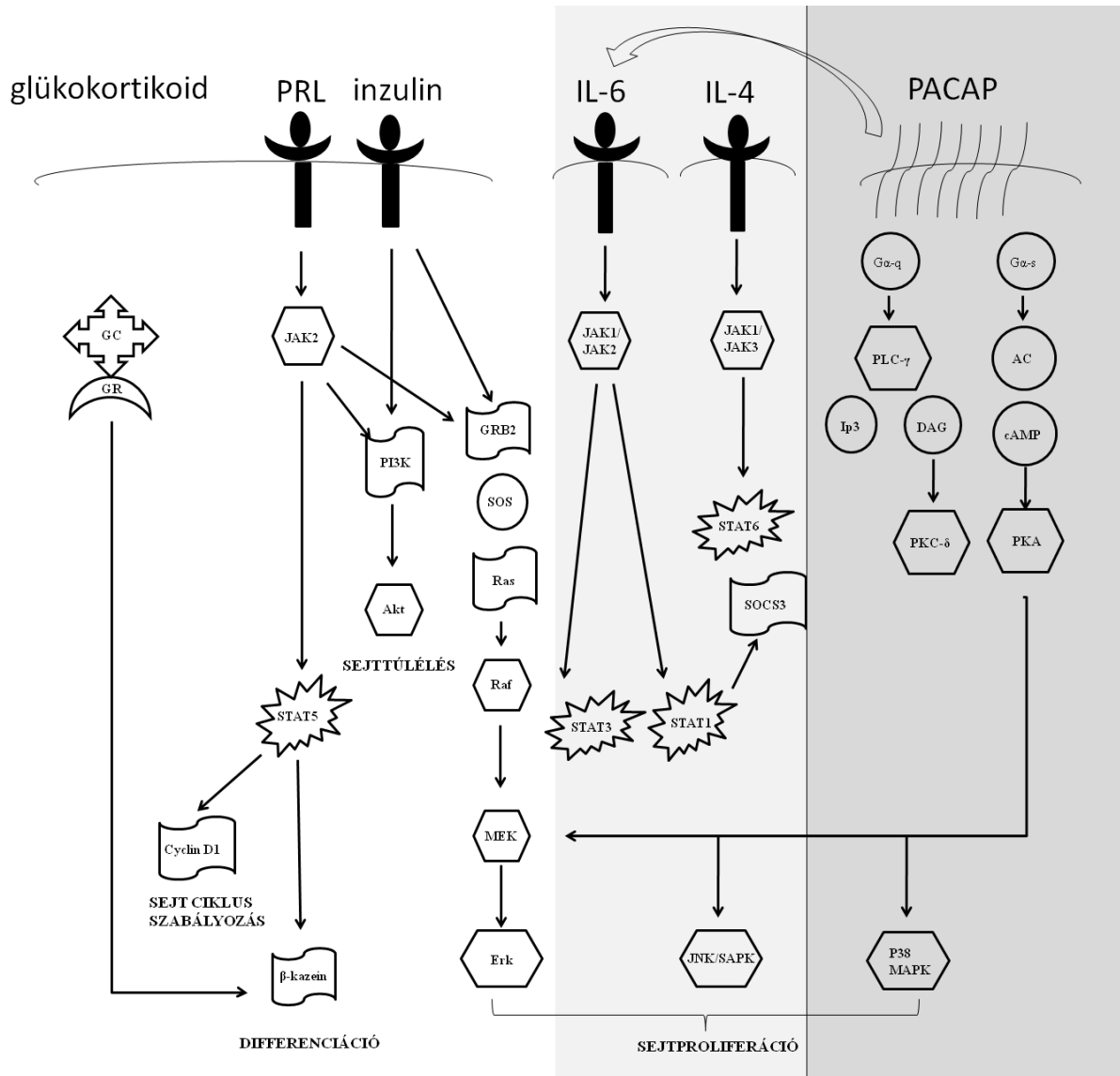
Ugyancsak a HC11 sejtvonalon végzett vizsgálatok derítették fényt az inzulin az emlőhámsejtek növekedésében, túlélésében és differenciációjában betöltött szerepére. A HC11 sejtek konfluens állapotának eléréséhez az EGF és az inzulin jelenléte nélkülözhetetlen. Az inzulin a vizsgálatainkban használt DIP mix elengedhetetlen összetevője. Inzulin hiányában a PRL és a dexametazon kettős kombinációja nem eredményez β -kazein expressziót. A fiziológias dózisú inzulin védi az emlősejteket az apoptózistól (foszforiláció révén aktiválja az Akt-t), a PRL-nal együtt azonban laktogén hormon aktivitást mutat (serkenti a β -kazein szintézist) és előmozdítja a sejtproliferációt (fokozott DNS átíródás a p38 MAPK/ERK foszforilációjának következményeként) (Merlo és mtsai 1996).

Berlato és Doppler az inzulin-szubsztitúció kérdését a HC11 sejteken egy másik megközelítésből is elemezte. Vizsgálataik során sem a fiziológias dózisban adott IGF-1, sem az IGF-2 nem volt képes helyettesíteni az inzulint a DIP mixben és nem stimulálta a tejfehérjék expresszióját sem. Differenciálatlan sejteken az inzulin és az IGF-ek egyaránt növelték az Akt és a MAPK/ERK foszforilációját, azonban a differenciált sejtek esetében ez a hatás csak az inzulin-adagolást követően volt megfigyelhető. A differenciálatlan és a differenciált sejtek eltérő viselkedésére az adhat magyarázatot, hogy az IGF-receptorok és az A-típusú inzulin receptorok (IR-A-k), melyek képesek kötni az IGF-eket, a differenciáció során downregulálódnak, kitüntetett szerepet biztosítva a csaknem szelektív inzulin kötő IR-B-nek (Berlato és Doppler 2009).

A laktogén differenciációban szerepet játszó jelátviteli útvonalakat a 15. ábra szemlélteti.

4.6.2. PACAP és a HC11 sejtek laktogén differenciálódása

Kísérletünkben DIP kezelés hatására detektálni tudtuk a β -kazein expresszióját a HC11 sejteken, de a PACAP nem befolyásolta sem a PRL-indukálta differenciálódást, sem a β -kazein termelődést, sem a jelátviteli útvonalakat.



15. ábra. Az emlőhámsejtek differenciálódásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak. A PRL hatásának kifejtéséhez a glükokortikoidok és az inzulin jelenléte is szükséges. A tejfehérje megjelenését közvetlenül csak a PRL és a glükokortikoidok befolyásolják. A sejtek differenciálódásának létrejöttéhez a sejtülés fenntartása nélkülözhetetlen, ezt elsősorban az inzulin biztosítja. A citokinek különböző JAK-okat és egyéb STAT-okat aktiválnak, szerepük a differenciálódás jelátviteli mechanizmusában szintén feltételezett. Az ábrán példaként az IL-4 és IL-6 kapcsolódási pontjai és a PACAP „általános” jelátviteli rendszere is feltüntetésre került. A PACAP nem csak a sejtproliferációs útvonalakat képes aktiválni, hanem a PAC1 receptoron keresztül emeli az IL-6 expressziót, amely JAK/STAT3 foszforilációt eredményezhet. Kísérleti modellünkben a PACAP feltételezett kapcsolódását az Akt, STAT útvonalakhoz nem sikerült bizonyítani, és az IL-ok nem adtak megfelelően értékelhető jeleket.

4.7. HC11 sejtek cito- és kemokin, valamint növekedési faktor szekréciója

4.7.1. Inzulinszerű növekedési faktorok és hordozó fehérjék

Az „angiogenesis array”-vel egyebek mellett vizsgáltuk az IGF-ek hordozó fehérjéinek, az IGFBP-ek szekrécióját differenciált és differenciálatlan HC11 sejteken. Méréseink szerint, hasonlóan a Comma-1D (HC11 progenitor) sejteken végzett korábbi vizsgálatokhoz (Skaar és Baumrucker 1993), a differenciálatlan sejtek médiumaiban az IGFBP3 jól detektálható. Figyelemre méltó, hogy az IGFBP3 expressziója DIP kezelés hatására saját vizsgálatunkban csökkent, ez jól összevethető az IGFBP-ek laktáció alatt észlelhető fiziológiás csökkenésével (Allar és Wood 2004). A szállítófehérje funkciót betöltő IGFBP-ek csökkenése növelheti ugyanis a szabad IGF szintet, ezzel maximális hatást biztosít a PRL által indukált alveoláris differenciáció számára.

Az IGF szerepét a PRL indukálta alveoláris morfogenezisben bizonyítja, hogy IGF-2 KO egerek alveoláris morfogenezise megkésett, illetve az exogén IGF-2 javítja a PRL receptor KO egerek kóros alveoláris morfogenezisét. Bizonyított, hogy a ciklin D1 hiányos emlősejtek képtelenek a PRL válaszra, nem proliferálnak, azonban IGF-2 adást követően a ciklin D1 expresszió emelkedik. A PRL emeli az IGF-2 mRNS szintet, amely következményes ciklin D1 protein expressziót és proliferációt idéz elő, ezért az IGF-2-t a PRL indukált alveologenezis mediátorának tekintik (Brisken és mtsai 2002b).

A differenciálatlan sejtek IGFBP3 szekréciója ellentmondó. Phillips és mtsai szerint a differenciálatlan HC11 sejtek nem szekretálnak IGFBP3-at. A differenciált sejtek médiumaiban az IGFBP2 csökkent, az IGFBP5 szekréciója pedig nőtt (Phillips és mtsai 2003). A szerzők az IGFBP2 szekréciójában bekövetkező csökkenést és az IGFBP5 szintjének emelkedését nem differenciációs hatásnak, hanem a dexametazon gátló és a PRL stimuláló hatásának tulajdonították, és a modellt nem tartották alkalmasnak az IGF-IGFBP tengely egzakt vizsgálatára.

4.7.2. Interleukinok

A laktogén differenciálódást nem hormonális úton befolyásoló tényezőkről a bevezető fejezetben már történt említés. Khaled és mtsai a HC11 sejtekhez hasonló KIM2 sejteken vizsgálta a citokinek differenciáció során bekövetkező expressziós és szekréciós változásait. A különbség a két sejtvonal között az, hogy a HC11 sejtek spontán, ezzel szemben a KIM2 sejtek feltételesen immortalizált sejtenyészetek (Gordon és mtsai 2000). Vizsgálatainkban DIP

stimulációt követően az emlősejtek laktogén differenciációt mutattak, a 2. naptól β -kazeint és a 8. naptól pedig WAP-ot expresszáltak. Az IL-ok differenciációban betöltött szerepére az utalt, hogy a sejtek IL-13R α és az IL-4R α expressziója a differenciáció 2. napján emelkedett. IL-4 és IL-13 adását követően a sejtek STAT6 fehérjéje foszforilálódott (Khaled és mtsai 2007). Ehhez hasonló IL-4 mediált STAT6 aktivációt és β -kazein promotor indukciót figyeltek meg a HC11 sejtek esetében is (Moriggl és mtsai 1997).

A KIM2 sejteken végzett citokin array vizsgálatok során magasabb IL-4, illetve csökkent G-CSF és IL-6 szekréciót észleltek a 8 napos differenciált sejteken, az egyéb Th2 citokinek (IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, IL-10 és IL-13) nem mutattak különbséget. QRT-PCR-ral a differenciáció indukciójával egyidejű Th1/Th2 citokin váltást figyeltek meg: az IL-12 és TNF α downregulálódott, egyidejűleg az IL-4, IL-5 és IL-13 upregulálódott (Khaled és mtsai 2007).

Saját kísérleteinkkel nem tudunk alátámasztani hasonló változásokat az IL-4, IL-6 és G-CSF expresszióban differenciált HC11 sejteken, amely feltehetően sejtvonal specifikus hatásnak és az eltérő indukciós módszereknek tulajdonítható. Az általunk használt citokin array-en az IL-ok gyenge, analízisre alkalmatlan jelet adtak.

4.7.3. Kemokinek

Eredményeink szerint a laktogén differenciáció során szignifikánsan csökkent a HC11 sejtek IP-10 és RANTES kemokin szekréciója. Az IP-10 és a RANTES kemokinek felelősek a T-limfociták és egyéb leukociták „recruitment”-jéért (Schall és mtsai 1990; Angiolillo és mtsai 1995). Az IP-10 és a RANTES megtalálható az anyatejben és az emlőben és szerepet játszik a limfocita „homing” egyensúlyának fenntartásában az emlő különböző fejlődési stádiumaiban (Michie és mtsai 1998; Takahata és mtsai 2003). Terhesség ideje alatt a T-sejtek, laktáció során pedig az Ig-A-t tartalmazó B-sejtek kolonizációja dominál az emlőben (Tanneau és mtsai 1999). Így a HC11 sejtek csökkent T-sejt kemoattraktáns IP-10 és RANTES szekréciója T- és B-sejtek váltására utalhat a laktáló emlőben.

4.7.4. Növekedési faktorok

A differenciált HC11 sejtek médiumaiban az EGF-receptor (EGFR) ligandok, az AREG és az EGF, szignifikáns csökkenését észleltük. Az EGFR ligandok strukturálisan és funkcionálisan hasonló fehérjék, melyek sejtproliferációt és differenciációt okoznak. A családba tartozik az EGF, az AREG, a heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF), a TGF- α , a

betacellulin, az epigen, az epiregulin, a heregulin és a neuregulin. A csoportban legnagyobb strukturális hasonlóságot az AREG, az EGF és a TGF α mutat. Az AREG egy heparin kötő, glikozilált protein, C-terminálisának 38 %-a megegyezik az EGF C-terminálisának aminosav összetételével. A fehérjét az MCF-7-es sejtek EGFR ligandjaként azonosították (Shoyab és mtsai 1988).

Az AREG KO anyaállatok nem szoptatnak megfelelően, az újszülöttek mortalitása magas, gyomruk egyáltalán nem, vagy csak kis mennyiségben tartalmaz tejet. Az AREG a dukális morfogenezishez nélkülözhetetlen, ezzel szemben az EGF és a TGF α elhanyagolható ebben a folyamatban (Luetke és mtsai 1999). Az AREG membrán asszociált prekuzorként expresszálódik, majd szekretálódva kötődik a strómában lévő EGFR-okhoz, és fontos szerepet játszik a strómasejtek FGF, HGF és IGF1 termelésében. Ezt követően a strómasejtek által termelt növekedési faktorok stimulálják a környező emlőhámsejtek proliferációját (McBryan és mtsai 2008).

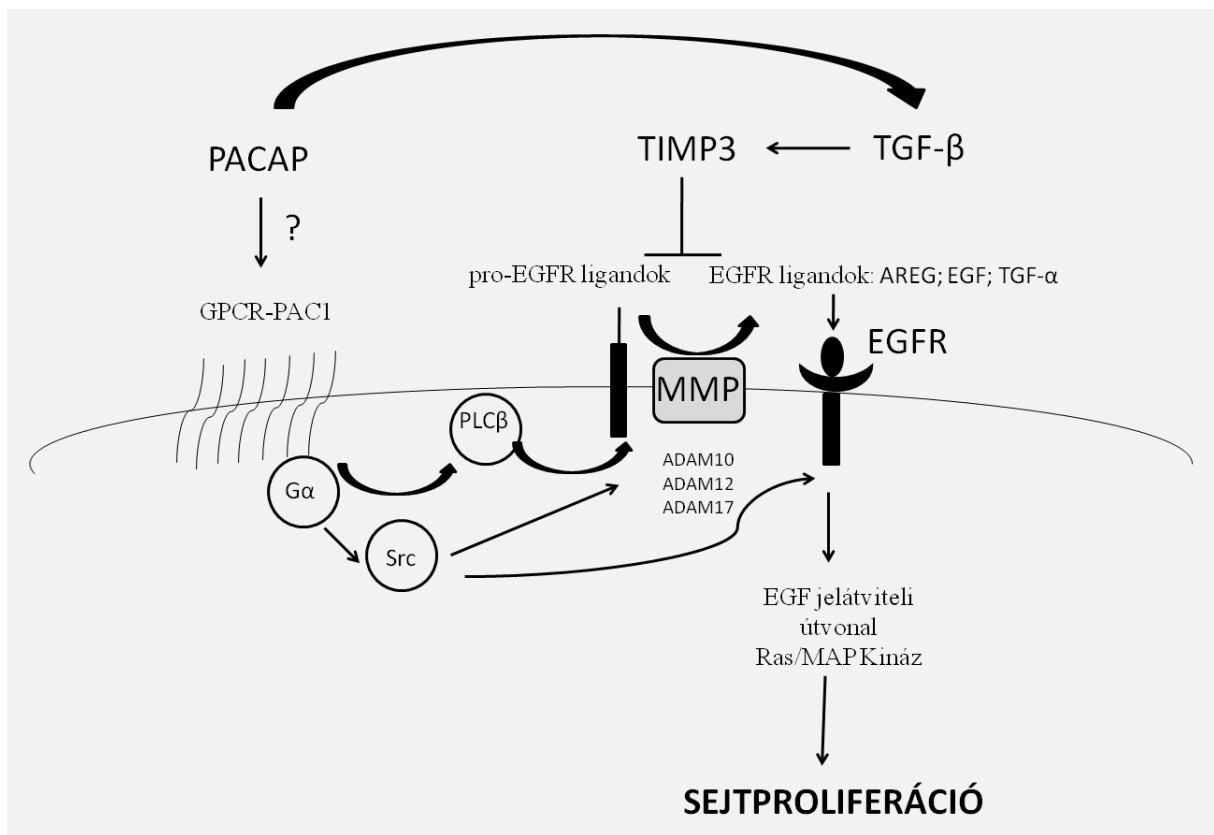
Ismert, hogy az EGF blokkolja a differenciációt (β -kazein, WAP termelés) és akár dedifferenciációt is okozhat. Az emlő differenciációja a stimuláló (PRL, inzulin, dexametazon) és a gátló (TGF β , progeszteron) hatások egyensúlyának függvénye. Az EGF szerepére hívja fel a figyelmet, hogy plazma szintje és receptorának expressziója terhességkor nő, és a laktáció előtt csökken (Oka és mtsai 1991). Az EGF hatására a differenciált sejtek ellapulnak, az intracelluláris zsírcseppek száma csökken, a WAP drámai, a β -kazein expresszió enyhe csökkenést mutat, és hasonlóképpen csökken a mammary-derived growth inhibitor (MDGI) szintje is. Ezzel ellentétben az EGF stimulálja a TGF α -t, ezért feltételezik, hogy a TGF α mediálja az EGF hatását (Spitzer és mtsai 1995).

A differenciált HC11 sejtek vizsgálatainkban észlelt csökkent AREG és EGF szekréciója tükrözheti a proliferációs szakaszból a laktogén differenciálódásra történő átváltást és összhangban van a felsorolt kísérleti adatokkal. Az AREG átíródását a PRL szabályozza, azonban a PRL által regulált AREG, illetve EGF szekrécióról nem áll rendelkezésre adat (Ormandy és mtsai 2003). Kísérleteinkben a PRL az alkalmazott hormonkeverék állandó összetevője volt, így nem kizárt, hogy akár közvetlen hatása lehet az AREG szekréciójára.

4.8. A PACAP hatása a differenciálatlan emlősejtek AREG és EGF szekréciónak

4.8.1. Az EGF, AREG és TGF α szekréciónak szabályozása

A PACAP indukálta AREG és EGF szekréciónak csökkenés a differenciálatlan HC11 sejteken csökkent ligand „shedding” és/vagy csökkent EGFR ligand expresszió következménye lehet. Az AREG, az EGF és a TGF α „shedding”-jéért, valamint a következményes EGFR aktivációért az „a disintegrin and metalloproteinase domain (ADAM)-17” metalloproteináz a felelős, melyet a TGF- β gátolni képes (Sternlicht és mtsai 2005). A TGF- β hatását az ADAM17-en a tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3 upregulálásán keresztül fejt ki (Leivonen és mtsai 2013). A TGF- β PACAP KO egerekben downregulált, és kísérletes adatok utalnak arra, hogy a PACAP közvetlenül képes stimulálni a TGF- β -t (Tan és mtsai 2009; Wada és mtsai 2013). A felsoroltak alapján feltételezhető, hogy a TGF- β és ennek következményeként a TIMP3 a PACAP hatására upregulálódik, és ez gátolja az ADAM17-et, és ezen keresztül az AREG és az EGF „shedding”-jét (16. ábra). Az általunk megfigyelt PACAP indukálta EGFR ligand szekréciónak csökkenés háttérében álló mechanizmus pontos feltérképezése újabb kísérletek kiindulópontja lehet.



16. ábra. A PACAP által kiváltott ligand „shedding” és EGFR transaktiváció feltételezett mechanizmusa.

4.8.2. EGF és AREG, valamint egyes neuropeptidek és az EGFR aktivációja

Az EGFR aktivációjának kitüntetett szerepe van a sejtproliferáció megindításában és fenntartásában. A receptor transzaktivációját elsősorban az EGF, az AREG és a TGF α szekrécija szabályozza, melynek mechanizmusát HC11 sejteken is vizsgálták. A HC11 sejtek egyaránt expresszálják az EGFR-t és a HGF receptorát a MET-t. Azonban sem rövid, sem hosszú idejű inkubáció után nem tapasztalható EGF indukálta MET, illetve HGF mediált EGFR aktiváció. A transzaktiváció ezen formája tehát ebben a modellben kizárhatónak látszik (Accornero és mtsai 2010).

A folyamatot egyebek mellett különböző neuropeptidek is elindíthatják. VIP kezelést követően human epidermal growth factor receptor (HER)-2, illetve EGFR transzaktiváció figyelhető meg prosztatából és vastagbélből származó tumorsejteken (Bertelsen és mtsai 2004; Sotomayor és mtsai 2007). Valdehita és mtsai a VIP transzaktiváló hatását vizsgálták ösztrogén-dependens (alacsony EGFR és magas HER2 expresszió) és ösztrogén-independens (EGFR overexpresszió és HER2 hiány) emlőkarcinómás sejteken. A HER2, 3 és 4 receptorok mellett az EGFR is a HER receptor család tagja. Az idézett kísérletben a VIP egyaránt stimulálta a HER2 és az EGFR foszforilációját, amely VIP receptor antagonistá adásával gátolható volt (Valdehita és mtsai 2009).

Kissejtes tüdőkarcinómán végzett kísérletek szerint a GPCR agonista bombesin és neuromedin B a TGF α szekréciján keresztül képes az EGFR-t transzaktiválni (Lui és mtsai 2003; Moody és mtsai 2010). Moody és mtsai ugyancsak kissejtes tüdőkarcinómás sejtvonalon végzett vizsgálataiban PACAP-kezelés után is EGFR transzaktiváció volt mérhető, azonban ez elmaradt VIP, PACAP6-38 és anti-TGF α adását követően. Ennek alapján a transzaktivációs folyamat a következőképpen írható le: a PAC1/PACAP interakció a cAMP/PKA jelátviteli útvonalon keresztül stimulálja Src/ADAM17-et, megnövelve a TGF- α szekrécit, amely végül aktiválja az EGFR-t (16. ábra). Anti-AREG adása nem befolyásolta a transzaktivációt, így arra lehetett következtetni, hogy a vizsgálatokban nem az AREG „shedding”-je emelkedett (Moody és mtsai 2012).

4.8.3. Az AREG szerepe az emlőtumorok növekedésében

Az AREG kiemelkedően fontos növekedési faktorként ismert az emlőtumorok proliferációjának és a tumorsejtek EGFR transzaktivációjának szabályozásában. Az EGFR dependens emlőtumorok ugyanis ADAM közvetített EGFR ligand „shedding”-et használnak, így az AREG ígéretes támadáspontja lehet az emlőtumorok kezelésének. Az AREG szerepét

az emlőtumor kialakulásában és progressziójában az is bizonyítani látszik, hogy szintje magasabb az invazív, mint az *in situ* duktális karcinómákban, vagy a normál emlőben. *In vivo* szuppressziója csökkent tumor formációt eredményez (McBryan és mtsai 2008). Érdekes, hogy az AREG a csontmetasztázis kialakulásában is szerepet játszik, mivel az EGFR-on keresztül stimulálja a parathyroid hormone-like hormone (PTHrP) termelést, és ezen keresztül előmozdítja a csontresorpciót (Gilmore és mtsai 2007). Eredményeink arra utalhatnak, hogy a PACAP az emlőhámsejteken a VIP-pel ellentétes hatást fejthet ki az EGFR aktivációja tekintetében, ezért az általunk észlelt PACAP-mediált AREG és EGF szekrúciósökkenés a kísérletes daganatkutatás számára is értékes adatként szolgálhat.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

5.1. Vizsgálataink tárgya

Kísérleteink során RIA-val detektáltuk az anyatej PACAP38-IR változását a laktációs periódus alatt és meghatároztuk a PACAP38-IR-t a kereskedelmi forgalomban kapható tehéntej alapú tejporokban, tápszerekben és pasztörizált tehéntejben. Tömegspektrometriával vizsgáltuk, hogy a tápszermintákban a RIA-val mérhető aktivitás valóban a PACAP38-nak felel-e meg.

Mikroszkóposan elemeztük a PAC1 receptor expresszióját laktáló és nem laktáló emlőmintákon, valamint különböző emlőhámok sejtenyészetein (HMEC, MCF-7, MDA-MB-468, HC11).

Egérből származó HC11 emlőhámsejteken laktogén differenciálódást idéztünk elő, melynek megtörténtét Western blot analízissel igazoltuk. Vizsgáltuk a PACAP esetleges szerepét a sejtdifferenciálódásban. Egér citokin és angiogenezis array segítségével összehasonlítottuk a differenciált és a differenciálatlan sejtek által szekretált cito- és kemokinek, valamint növekedési faktorok szintjét, továbbá nyomon követtük, hogy a nevezett faktorokra a sejt eltérő differenciálódási állapotában a PACAP kezelés milyen hatással van.

5.2. Vizsgálataink eredményei

- Szignifikánsan magasabb PACAP38-IR mértünk a humán kolosztrumban az érett anyatejhez viszonyítva. Kimutattuk a PACAP38 felhalmozódását az anyatejben a szoptatás 10. hónapját követően. Nem találtunk különbséget a mért PACAP38-IR tekintetében az átmeneti tejben, valamint az elő- és utótejben.
- Pasztörizált és friss tehéntejek, valamint tejporok esetében hasonló PACAP38-IR mértünk. A tömegspektrometriás analízis szerint a PACAP38 jelen volt a kereskedelmi forgalomban kapható tehéntej alapú tápszerekben. A hipoallergén, extenzíven hidrolizált tápszerek esetében szignifikánsan magasabb volt a PACAP38-IR, mint a nem hipoallergén tápszermintákban.
- A PAC1 kimutatható volt az összes vizsgált hisztológiai és citológiai mintánkban. A laktáló emlőben fokozott PAC1 receptor expressziót észleltünk a nem laktáló mintákhoz képest.

- Vizsgálatainkban a PACAP nem befolyásolta az emlősejtek differenciációját, sem a differenciációra specifikus β -kazein expresszió, sem pedig a differenciációban szerepet játszó jelátviteli útvonalak (STAT5, p38 MAPK, Akt) szintjén.
- Egyes kemokinek és növekedési faktorok, így a RANTES, IP-10, AREG, EGF és IGFBP3 szekréciója szignifikánsan alacsonyabb volt a differenciált HC11 sejtek médiumában, mint a differenciálatlanokéban.
- A PACAP-kezelt differenciálatlan HC11 sejtek szignifikánsan alacsonyabb szinten szekretálták az AREG-t és az EGF-t.

5.3. Eredményeink értékelése

Vizsgálataink bizonyítják, hogy a PACAP biológiailag effektív koncentrációban mérhető az anyatejben és különböző tejalapú készítményekben, ebből következően feltételezhető, hogy hatást gyakorolhat nem csak az újszülött fejlődésére, hanem magára az anyai emlőszövetre is.

Jellegzetes a PACAP koncentrációjának változása az anyatejben a szoptatás során. Az egészen korai (kolosztrum) és késői fázisban (szoptatás terminációs szakasza) magas, a köztes időszakban (érett tej) pedig alacsonyabb, de stabil értékeket mutat. Ezek a változások bizonyos párhuzamosságot sejtetnek az emlőszövetben lezajló, jól ismert proliferációs és differenciációs folyamatokkal.

A PAC1 receptorok mikroszkópos vizsgálata arra utal, hogy a PAC1 receptor expresszió az emlősejtek konstitucionális sajátossága, az expresszió mértéke azonban függ a sejt származásától (faj, normál, illetve tumoros sejt) és annak differenciáltsági állapotától.

A PACAP-nak az emlőhámsejtek laktogén differenciációra kifejtett hatását igazolni nem tudtunk, de az erre irányuló vizsgálatok során néhány szekretált cito- és kemokin, valamint növekedési faktorra vonatkozóan figyelemre méltó adatokat nyertünk.

Az emlősejtek differenciálódásával összefüggő, a cito- és kemokineket, valamint a növekedési faktorokat érintő szekrécióváltozások nem csak a proliferáció és a differenciáció fázisait követő és azokkal összhangban álló jelenségként érdekesek, hanem alapvető regulatórikus összefüggésekre is rámutathatnak. Ebből a szempontból külön figyelemre méltó lehet a PRL és az AREG feltételezett kapcsolata.

A PACAP által befolyásolt EGF és AREG szekrécióval kapcsolatos irodalmi hivatkozással nem találkoztunk, ezért ez a megfigyelésünk új adatnak számít. A HC11 sejtek viselkedése modellértékű a laktogén differenciálódás vonatkozásában. Arra vonatkozóan azonban nem tudunk nyilatkozni, hogy a HC11 sejteken a növekedési faktorok tekintetében észlelt változások sejtvonal specifikusak, vagy az emlősejtekre általánosan jellemzőek, esetleg alapvető sejtbiológiai jelentőséggel bírnak.

Eredményeink a PACAP regulatórikus funkcióját feltáró további érdekes vizsgálatok alapjául szolgálhatnak (szállítófehérjéjének meghatározása a tejben, befolyása az újszülött PRL szekréciójára és bélflórájára, valamint szerepének tisztázása EGFR aktivációjában).

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Accornero P, Miretti S, Cucuzza LS, Martignani E, Baratta M. (2010) Epidermal growth factor and hepatocyte growth factor cooperate to enhance cell proliferation, scatter, and invasion in murine mammary epithelial cells. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 115-125.
2. Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ. (2007) Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2604-2618.
3. Allar MA, Wood TL. (2004) Expression of the insulin-like growth factor binding proteins during postnatal development of the murine mammary gland. *Endocrinology.* 145, 2467-2477.
4. Altman J. (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 465-513.
5. Anderson ST, Sawangjaroen K, Curlewis JD. (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide acts within the medial basal hypothalamus to inhibit prolactin and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 137, 3424-3429.
6. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J. Exp. Med.* 182, 155-162.
7. Arbogast LA, Voogt JL. (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) increases prolactin release and tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity. *Brain. Res.* 655, 17-24.
8. Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C. (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology.* 129, 2787-2789.
9. Baintner K. (2007) Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 153-161.
10. Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, Groner B. (1988) Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* 7, 2089-2095.
11. Balogh A, Pap M, Markó L, Koloszar I, Csatary LK, Szeberényi J. (2011) A simple fluorescent labeling technique to study virus adsorption in Newcastle disease virus infected cells. *Enzyme. Microb. Technol.* 49, 255-259.

12. Baranowska-Bik A, Kochanowski J, Uchman D, Wolinska-Witort E, Kalisz M, Martynska L, Baranowska B, Bik W. (2013) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in humans with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 263, 159-161.
13. Baratta M, Grolli S, Tamanini C. (2003) Effect of leptin in proliferating and differentiated HC11 mouse mammary cells. *Regul. Pept.* 113, 101-107.
14. Berlato C, Doppler W. (2009) Selective response to insulin versus insulin-like growth factor-I and -II and up-regulation of insulin receptor splice variant B in the differentiated mouse mammary epithelium. *Endocrinology.* 150, 2924-2933.
15. Bertelsen LS, Barrett KE, Keely SJ. (2004) Gs protein-coupled receptor agonists induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in T84 cells: implications for epithelial secretory responses. *J. Biol. Chem.* 279, 6271-6279.
16. Berthon P, Mirossay L, Ito S, Calvo F, Gespach C. (1992) Functional expression of VIP receptors in normal, immortalized and transformed mammary epithelial cells. *Life. Sci.* 50, 791-798.
17. Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur. J. Endocrinol.* 160, 561-565.
18. Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, Fournier A. (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides.* 29, 919-932.
19. Bourgault S, Chatenet D, Wurtz O, Doan ND, Leprince J, Vaudry H, Fournier A, Vaudry D. (2011) Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1002-1024.
20. Brisken C, Ayyanan A, Doppler W. (2002a) Prolactin signaling and Stat5: going their own separate ways? *Breast. Cancer. Res.* 4, 209-212.
21. Brisken C, Ayyannan A, Nguyen C, Heineman A, Reinhardt F, Tan J, Dey SK, Dotto GP, Weinberg RA. (2002b) IGF-2 is a mediator of prolactin-induced morphogenesis in the breast. *Dev. Cell.* 3, 877-887.
22. Brubel R, Boronkai A, Reglődi D, Rác B, Németh J, Kiss P, Lubics A, Tóth G, Horváth G, Varga T, Szógyi D, Fónagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei S, Szereday L, Koppán M, Tamás 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. *J. Mol. Neurosci.* 42, 450-458.
23. Brubel R, Reglődi D, Jámbor E, Koppán M, Várnagy A, Bíró Z, Kiss P, Gaál V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bódis J, Bay C, Veszprémi B, Tamás A, Németh J, Márk L. (2011) Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* 46, 189-194.
 24. Brubel R, Kiss P, Vincze A, Varga A, Várnagy A, Bódis J, Márk L, Jámbor É, Maász G, Hashimoto H, Helyes Z, Tóth G, Tamás A, Koppán M, Reglődi D. (2012) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on human sperm motility. *J. Mol. Neurosci.* 48, 623-630.
 25. Budayr AA, Halloran BP, King JC, Diep D, Nissenson RA, Strewler GJ. (1989) High levels of a parathyroid hormone-like protein in milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 7183-7185.
 26. Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA. (2001) Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat. Cell. Biol.* 3, 460-465.
 27. Calhoun DA, Christensen RD. (1998) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) concentrations in human milk. *Pediatr. Res.* 43, 257-257.
 28. Catinella S, Traldi P, Pinelli C, Dallaturca E, Marsilio R. (1996) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in milk science. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 10, 1629-1637.
 29. Cavallaro S, Copani A, D'Agata V, Musco S, Petralia S, Ventra C, Stivala F, Travali S, Canonico PL. (1996) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Mol. Pharmacol.* 50, 60-66.
 30. Cazillis M, Gonzalez BJ, Billardon C, Lombet A, Fraichard A, Samarut J, Gressens P, Vaudry H, Rostène W. (2004) VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 19, 798-808.
 31. Chang JY, Korolev VV, Wang JZ. (1996) Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 206, 181-184.
 32. Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes. Dev.* 13, 2604-2616.

33. Chen W, Inui T, Hachiya T, Ochi Y, Nakajima Y, Kajita Y. (1993) Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 923-929.
34. Chen A, Laskar-Levy O, Koch Y. (1999) Selective expression of neuropeptides in the rat mammary gland: somatostatin gene is expressed during lactation. *Endocrinology.* 140, 5915-5921.
35. Chiancone E, Gattoni M, Giampietro PG, Ragno V, Businco L. (1995) Detection of undegraded beta-lactoglobulins and evaluation of the molecular weight of peptides in hydrolysate cow's milk formulae. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 5, 228-231.
36. Chiodera P, Volpi R, Capretti L, Coiro V. (1995) Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on arginine vasopressin and oxytocin secretion in man. *Neuroreport.* 6, 1490-1492.
37. Chiodera P, Volpi R, Capretti L, Caffarri G, Magotti MG, Coiro V. (1996) Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on adenohipophyseal hormone secretion in normal men. *Neuroendocrinology.* 64, 242-246.
38. Chowanadisai W, Lönnerdal B. (2002) Alpha(1)-antitrypsin and antichymotrypsin in human milk: origin, concentrations, and stability. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 828-833.
39. Collado B, Carmena MJ, Sanchez-Chapado M, Ruíz-Villaespesa A, Bajo AM, Fernandez-Martínez AB, Varga JL, Schally AV, Prieto JC. (2005) Expression of vasoactive intestinal peptide and functional VIP receptors in human prostate cancer: antagonistic action of a growth-hormone-releasing hormone analog. *Int. J. Oncol.* 26, 1629-1635.
40. Cowie AT. (1974) Proceedings: Overview of the mammary gland. *J. Invest. Dermatol.* 63, 2-9.
41. Czeplédi L, Tamás A, Börzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horváth G, Brubel R, Németh J, Szalontai B, Szabadfi K, Jávör A, Reglódi D, Helyes Z. (2011) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 115-119.
42. Delgado M, Garrido E, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. (1996) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP27 and PACAP38) protect CD4+CD8+ thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood.* 87, 5152-5161.
43. Delgado M, Leceta J, Gomariz RP, Ganea D. (1999) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression. *J. Immunol.* 163, 3629-3635.

44. Delgado M, Leceta J, Sun W, Gomariz RP, Ganea D. (2000) VIP and PACAP induce shift to a Th2 response by upregulating B7.2 expression. *Ann. NY. Acad. Sci.* 921, 68-78.
45. Delgado M, Ganea D. (2000) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit antigen-induced apoptosis of mature T lymphocytes by inhibiting Fas ligand expression. *J. Immunol.* 164, 1200-1210.
46. Delgado M, Ganea D. (2001) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit expression of Fas ligand in activated T lymphocytes by regulating c-Myc, NF-kappa B, NF-AT, and early growth factors 2/3. *J. Immunol.* 166, 1028-1040.
47. Desrivières S, Prinz T, Castro-Palomino Laria N, Meyer M, Boehm G, Bauer U, Schäfer J, Neumann T, Shemanko C, Groner B. (2003) Comparative proteomic analysis of proliferating and functionally differentiated mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Proteomics.* 2, 1039-1054.
48. Doan ND, Chatenet D, Létourneau M, Vaudry H, Vaudry D, Fournier A. (2012a) Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823, 940-949.
49. Doan ND, Létourneau M, Vaudry D, Doucet N, Folch B, Vaudry H, Fournier A, Chatenet D. (2012b) Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J. Control. Release.* 163, 256-265.
50. Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE, Banks WA. (2009) Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 411-422.
51. Doppler W, Groner B, Ball RK. (1989) Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 104-108.
52. Dow RC, Bennie J, Fink G. (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophysial portal blood in the normal male and female rat. *J. Endocrinol.* 142, 1-4.
53. Ducroc R, Rubio S, Garzon B, Brunel-Riveau B, Couraud JY. (1995) Immunoreactive substance P and calcitonin-gene-related peptide (CGRP) in rat milk and in human milk and infants formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 554-558.

54. Eilers E, Ziska T, Harder T, Plagemann A, Obladen M, Loui A. (2011) Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. *Early Hum. Dev.* 87, 415-419.
55. Elefsiniotis IS, Ketikoglou I, Kafiri G, Pantazis KD, Moulakakis A, Mavrogiannis C. (2003) Plasma pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels in chronic hepatitis B patients under lamivudine treatment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 1209-1216.
56. Eriksson M, Uvnäs-Moberg K. (1990) Plasma levels of vasoactive intestinal polypeptide and oxytocin in response to suckling, electrical stimulation of the mammary nerve and oxytocin infusion in rats. *Neuroendocrinology.* 51, 237-240.
57. Eriksson M, Björkstrand E, Smedh U, Alster P, Matthiesen AS, Uvnäs-Moberg K. (1994) Role of vagal nerve activity during suckling. Effects on plasma levels of oxytocin, prolactin, VIP, somatostatin, insulin, glucagon, glucose and of milk secretion in lactating rats. *Acta. Physiol. Scand.* 151, 453-459.
58. Eriksson M, Lindh B, Uvnäs-Moberg K, Hökfelt T. (1996) Distribution and origin of peptide-containing nerve fibres in the rat and human mammary gland. *Neuroscience.* 70, 227-245.
59. Fábrián E, Reglődi D, Mester L, Szabó A, Szabadfi K, Tamás A, Tóth G, Kovács K. (2012) Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *J. Mol. Neurosci.* 48, 493-500.
60. Fahrenkrug J, Steenstrup BR, Hannibal J, Alm P, Ottesen B. (1996) Role of PACAP in the female reproductive organs. *Ann. NY. Acad. Sci.* 805, 394-407.
61. Farkas O, Tamás A, Zsombok A, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczi T. (2004) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. *Regul. Pept.* 123, 69-75.
62. Filipsson K, Sundler F, Hannibal J, Ahren B. (1998) PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects. *Regul. Pept.* 74, 167-175.
63. Fonyó A. (2006) Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó RT. Budapest, III. kiadás. 785-906.
64. Ganea D, Delgado M. (2003) The neuropeptides VIP/PACAP and T cells: inhibitors or activators? *Curr. Pharm. Des.* 9, 997-1004.
65. Garcia-Fernandez MO, Bodega G, Ruiz-Villaespesa A, Cortes J, Prieto JC, Carmena MJ. (2004) PACAP expression and distribution in human breast cancer and healthy tissue. *Cancer Lett.* 205, 189-195.

66. García-Fernández MO, Collado B, Bodega G, Cortés J, Ruíz-Villaespesa A, Carmena MJ, Prieto JC. (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecol. Endocrinol.* 20, 327-333.
67. Garrel G, Lozach A, Bachir LK, Laverriere JN, Counis R. (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates nitric-oxide synthase type I expression and potentiates the cGMP response to gonadotropin-releasing hormone of rat pituitary gonadotrophs. *J. Biol. Chem.* 277, 46391-46401.
68. Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. (2006) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides.* 27, 87-94.
69. Gautvik KM, Kriz M. (1976) Effects of prostaglandins on prolactin and growth hormone synthesis and secretion in cultured rat pituitary cells. *Endocrinology.* 98, 352-358.
70. Gaytan F, Martinez-Fuentes AJ, Garcia-Navarro F, Vaudry H, Aguilar E (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell. Tissue. Res.* 276, 223-227.
71. Gilmore JL, Scott JA, Bouizar Z, Robling A, Pitfield SE, Riese DJ 2nd, Foley J. (2008) Amphiregulin-EGFR signaling regulates PTHrP gene expression in breast cancer cells. *Breast. Cancer. Res. Treat.* 110, 493-505.
72. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. (2006) VIP: an agent with license to kill infective parasites. *Ann. NY Acad. Sci.* 1070, 303-308.
73. Gordon KE, Binas B, Chapman RS, Kurian KM, Clarkson RW, Clark AJ, Lane EB, Watson CJ. (2000) A novel cell culture model for studying differentiation and apoptosis in the mouse mammary gland. *Breast. Cancer. Res.* 2, 222-235.
74. Gozes I, Fridkin M. (1992) A fatty neuropeptide. Potential drug for noninvasive impotence treatment in a rat model. *J. Clin. Invest.* 90, 810-814.
75. Gray SL, Cummings KJ, Jirik FR, Sherwood NM. (2001) Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol. Endocrinol.* 15, 1739-1747.
76. Gray SL, Yamaguchi N, Vencová P, Sherwood NM. (2002) Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology.* 143, 3946-3954.

77. Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR. (1993) Hormones and growth factors in milk. *Endocr. Rev.* 14, 710-728.
78. Gutierrez-Canas I, Rodriguez-Henche N, Bolanos O, Carmena MJ, Prieto JC, Juarranz MG. (2003) VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal. *Br. J. Pharmacol.* 139, 1050-1058.
79. Hannibal J. (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 453, 389-417.
80. Hannibal J. (2006) Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. *Int. Rev. Cytol.* 251, 1-39.
81. Hartmann PE, Kulski JK. (1978) Changes in the composition of the mammary secretion of women after abrupt termination of breast feeding. *J. Physiol.* 275, 1-11.
82. Hayez N, Harfi I, Lema-Kisoka R, Svoboda M, Corazza F, Sariban E. (2004) The neuropeptides vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) modulate several biochemical pathways in human leukemic myeloid cells. *J. Neuroimmunol.* 149, 167-181.
83. Hedlund P, Alm P, Ekström P, Fahrenkrug J, Hannibal J, Hedlund H, Larsson B, Andersson KE. (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 116, 2258-2266.
84. Hedlund P, Alm P, Hedlund H, Larsson B, Andersson KE. (1994) Localization and effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in human penile erectile tissue. *Acta. Physiol. Scand.* 150, 103-104.
85. Heindel JJ, Powell CJ, Paschall CS, Arimura A, Culler MD. (1992) A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating peptide, modulates Sertoli cell function in vitro. *Biol. Reprod.* 47, 800-806.
86. Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, Shimizu M, Onda H, Oshimura M, Arimura A, et al. (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1129, 199-206.
87. Huang SK, Pan JT. (1996) Stimulatory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide on tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in estrogen-treated ovariectomized rats and their correlation with prolactin secretion. *Neuroendocrinology.* 64, 208-214.

88. Hynes NE, Watson CJ. (2010) Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2, a003186.
89. Isaac ER, Sherwood NM. (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 280, 13-19.
90. Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron.* 8, 811–819.
91. Isobe K, Tatsuno I, Yashiro T, Nanmoku T, Takekoshi K, Kawakami Y, Nakai T. (2003) Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul. Pept.* 110, 213-217.
92. Jakab B, Reglődi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. (2004) Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 61, 189-198.
93. Jarmołowska B, Sidor K, Iwan M, Bielikowicz K, Kaczmarek M, Kostyra E, Kostyra H. (2007) Changes of beta-casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides.* 28, 1982-1986.
94. Jenssen H, Hancock RE. (2009) Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie.* 91, 19-29.
95. Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI. (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 476, 388-413.
96. Juskevich JC, Guyer CG. (1990) Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science.* 249, 875-884.
97. Kántor O, Molnár J, Arimura A, Köves K. (2000a) PACAP38 and PACAP27 administered intracerebroventricularly have an opposite effect on LH secretion. *Peptides.* 21, 817-820.
98. Kántor O, Molnár J, Heinzelmann A, Fürst Z, Arimura A, Köves K. (2000b) The inhibitory effect of PACAP38 on ovulation is mediated by CRF and endogenous opioids. *Ann .NY. Acad. Sci.* 921, 405-409.

99. Kántor O, Molnár J, Heinzlmann A, Arimura A, Füst Z, Köves K. (2001) Study on the hypothalamic factors mediating the inhibitory effect of PACAP38 on ovulation. *Peptides*. 22, 2163-2168.
100. Karatas Z, Durmus Aydogdu S, Dinleyici EC, Colak O, Dogruel N. (2011) Breastmilk ghrelin, leptin, and fat levels changing foremilk to hindmilk: is that important for self-control of feeding? *Eur. J. Pediatr.* 170, 1273-1280.
101. Kelly GS. (2003) Bovine colostrums: a review of clinical uses. *Altern. Med. Rev.* 8, 378-994.
102. Ken-Dror S, Weintraub Z, Yechiely H, Kahana L. (1997) Atrial natriuretic peptide and endothelin concentrations in human milk during postpartum lactation. *Acta. Paediatr.* 86, 793-795
103. Khaled WT, Read EK, Nicholson SE, Baxter FO, Brennan AJ, Came PJ, Sprigg N, McKenzie AN, Watson CJ. (2007) The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development.* 134, 2739-2750.
104. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. (2007) The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes. Rev.* 8, 21-34.
105. Ko C, In YH, Park-Sarge OK. (1999) Role of progesterone receptor activation in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene expression in rat ovary. *Endocrinology.* 140, 5185-5194.
106. Koch Y, Werner H, Fridkin M. (1991) Hypothalamic hormones in milk. *Endocr. Regul.* 25, 128-133.
107. Koppán M, Várnagy A, Reglödi D, Brubel R, Németh J, Tamás A, Márk L, Bódis J. (2012) Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. *J. Mol. Neurosci.* 48, 617-622.
108. Koshiyama H, Kato Y, Inoue T, Murakami Y, Ishikawa Y, Yanaihara N, Imura H. (1987) Central galanin stimulates pituitary prolactin secretion in rats: possible involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide. *Neurosci. Lett.* 75, 49-54.
109. 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, 264-271.
110. Köves K, Molnár J, Kántor O, Lakatos A, Fógel K, Kausz M, Vandermeers-Piret MC, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. (1998) Role of PACAP in the regulation of gonadotroph hormone secretion during ontogenesis: a single neonatal injection of PACAP delays

- puberty and its intracerebroventricular administration before the critical period of proestrous stage blocks ovulation in adulthood. *Ann. NY. Acad. Sci.* 865, 590-594.
111. Köves K, Kántor O, Molnár J, Heinzlmann A, Szabó E, Szabó F, Nemeskéri A, Horváth J, Arimura A. (2003) The role of PACAP in gonadotropic hormone secretion at hypothalamic and pituitary levels. *J. Mol. Neurosci.* 20, 141-152.
112. Lage M, Baldelli R, Camiña JP, Rodriguez-Garci J, Peñalva A, Dieguez C, Casanueva FF. (2002) Presence of bovine leptin in edible commercial milk and infant formula. *J. Endocrinol. Invest.* 25, 67067-67074.
113. Larivière S, Garrel G, Robin MT, Counis R, Cohen-Tannoudji J. (2006) Differential mechanisms for PACAP and GnRH cAMP induction contribute to cross-talk between both hormones in the gonadotrope LbetaT2 cell line. *Ann. NY Acad. Sci.* 1070, 376-379.
114. Latini S, Chiarpotto M, Muciaccia B, Vaccari S, Barberi M, Guglielmo MC, Stefanini M, Cecconi S, Canipari R. (2010) Inhibitory effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the initial stages of rat follicle development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 34-44.
115. Law FM, Moate PJ, Leaver DD, Diefenbach-Jagger H, Grill V, Ho PW, Martin TJ. (1991) Parathyroid hormone-related protein in milk and its correlation with bovine milk calcium. *J. Endocrinol.* 128, 21-26.
116. Lawlor-Smith C, Lawlor-Smith L. (1998) Lactose intolerance. *Breastfeeding Rev.* 6, 29-30.
117. Le SV, Yamaguchi DJ, McArdle CA, Tachiki K, Pisegna JR, Germano P. (2002) PAC1 and PACAP expression, signaling, and effect on the growth of HCT8, human colonic tumor cells. *Regul. Pept.* 109, 115-125.
118. Lee J, Park HJ, Choi HS, Kwon HB, Arimura A, Lee BJ, Choi WS, Chun SY. (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, 818-826.
119. Lee LT, Siu FK, Tam JK, Lau IT, Wong AO, Lin MC, Vaudry H, Chow BK. (2007) Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 2133-2138.
120. Leivonen SK, Lazaridis K, Decock J, Chantry A, Edwards DR, Kähäri VM. (2013) TGF- β -elicited induction of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 expression in fibroblasts involves complex interplay between Smad3, p38 α , and ERK1/2. *PLoS One.* 8, e57474.

121. Leyton J, Gozes Y, Pisegna J, Coy D, Purdom S, Casibang M, Zia F, Moody TW. (1999) PACAP(6-38) is a PACAP receptor antagonist for breast cancer cells. *Breast Cancer. Res. Treat.* 56, 177-186.
122. Li M, Cortez S, Nakamachi T, Batuman V, Arimura A. (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent inhibitor of the growth of light chain-secreting human multiple myeloma cells. *Cancer. Res.* 66, 8796-8803.
123. Lönnerdal B. (2003) Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1537S-1543S.
124. Lu M, Yao F, Guo A. (1995) A study on two gut hormones in breast milk. *Zhonghua. Fu. Chan. Ke. Za. Zhi.* 30, 554-556.
125. Lu N, DiCicco-Bloom E. (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 3357-3362.
126. Luetkeke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, Lee DC. (1999) Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development.* 126, 2739-2750.
127. Lui VW, Thomas SM, Zhang Q, Wentzel AL, Siegfried JM, Li JY, Grandis JR. (2003) Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene.* 22, 6183-6193.
128. Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ. (1993) The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* 334, 3-8.
129. Mace SR, Dean JG, Murphy JR, Rhodes JL, Kuruvilla HG. (2000) PACAP-38 is a chemorepellent and an agonist for the lysozyme receptor in *tetrahymena thermophila*. *J. Comp. Physiol. A.* 186, 39-43.
130. Masmoudi-Kouki O, Douiri S, Hamdi Y, Kaddour H, Bahdoudi S, Vaudry D, Basille M, Leprince J, Fournier A, Vaudry H, Tonon MC, Amri M. (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Neurochem.* 117, 403-411.
131. Matsuda K, Maruyama K, Nakamachi T, Miura T, Shioda S. (2006) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on food intake and locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1070, 417-421.

132. Matsuda K, Maruyama K. (2007) Regulation of feeding behavior by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vertebrates. *Peptides*. 28, 1761-1766.
133. Matsuda K, Azuma M, Maruyama K, Shioda S. (2013) Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in vertebrates. *Obes. Res. Clin. Pract.* 7, e1-e88.
134. Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A. (2003) Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) or PACAP type I receptor-mutant mice. *Neuroreport* 14: 2095-2098.
135. McBryan J, Howlin J, Napoletano S, Martin F. (2008) Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 13, 159-169.
136. McKenzie GJ, Fallon PG, Emson CL, Grecnis RK, McKenzie AN. (1999) Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J. Exp. Med.* 189, 1565-1572.
137. McMurtry JP, Malven PV. (1974) Radioimmunoassay of endogenous and exogenous prolactin in milk of rats. *J. Endocrinol.* 61, 211-217.
138. Merlo GR, Graus-Porta D, Cella N, Marte BM, Taverna D, Hynes NE. (1996) Growth, differentiation and survival of HC11 mammary epithelial cells: diverse effects of receptor tyrosine kinase-activating peptide growth factors. *Eur. J. Cell. Biol.* 70, 97-105.
139. Mester L, Kovács K, Rácz B, Solti I, Atlasz T, Szabadfi K, Tamás A, Reglődi D. (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is protective against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *J. Mol. Neurosci.* 43, 35-43.
140. Michie CA, Tantscher E, Schall T, Rot A. (1998) Physiological secretion of chemokines in human breast milk. *Eur. Cytokine. Netw.* 9, 123-129.
141. Mijiddorj T, Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Miyazaki K. (2011) Stimulatory effect of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) and its PACAP type I receptor (PAC1R) on prolactin synthesis in rat pituitary somatolactotroph GH3 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 339, 172-179.
142. Mikami N, Fukada S, Yamamoto H, Tsujikawa K. (2012) Neuronal derivative mediators that regulate cutaneous inflammations. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 307-320.

143. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574.
144. Miyata A, Jiang L, Dahl RD, 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). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 643-648.
145. Monaghan TK, MacKenzie CJ, Plevin R, Lutz EM. (2008) PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J. Neurochem.* 104, 74–88.
146. Moody TW, Leyton J, Chan D, Brenneman DC, Fridkin M, Gelber E, Levy A, Gozes I. (2001) VIP receptor antagonists and chemotherapeutic drugs inhibit the growth of breast cancer cells. *Breast. Cancer. Res. Treat.* 68, 55-64.
147. Moody TW, Berna MJ, Mantey S, Sancho V, Ridnour L, Wink DA, Chan D, Giaccone G, Jensen RT. (2010) Neuromedin B receptors regulate EGF receptor tyrosine phosphorylation in lung cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 637, 38-45.
148. Moody TW, Osefo N, Nuche-Berenguer B, Ridnour L, Wink D, Jensen RT. (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide causes tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 873-881.
149. Moriggl R, Berchtold S, Friedrich K, Standke GJ, Kammer W, Heim M, Wissler M, Stöcklin E, Gouilleux F, Groner B. (1997) Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3663-3678.
150. Murck H, Steiger A, Frieboes RM, Antonijevic IA. (2007) Pituitary adenylate cyclase activating peptide affects homeostatic sleep regulation in healthy young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E853-857.
151. Nagata A, Tanaka T, Minezawa A, Poyurovsky M, Mayama T, Suzuki S, Hashimoto N, Yoshida T, Suyama K, Miyata A, Hosokawa H, Nakayama T, Tatsuno I. (2009) cAMP activation by PACAP/VIP stimulates IL-6 release and inhibits osteoblastic differentiation through VPAC2 receptor in osteoblastic MC3T3 cells. *J. Cell. Physiol.* 221, 75-83.
152. Naylor MJ, Ginsburg E, Iismaa TP, Vonderhaar BK, Wynick D, Ormandy CJ. (2003) The neuropeptide galanin augments lobuloalveolar development. *J. Biol. Chem.* 278, 29145-29152.

153. Nielsen KM, Chaverra M, Hapner SJ, Nelson BR, Todd V, Zigmond RE, Lefcort F. (2004) PACAP promotes sensory neuron differentiation: blockade by neurotrophic factors. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 629-641.
154. Nicot A, Lelièvre V, Tam J, Waschek JA, DiCicco-Bloom E. (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J. Neurosci.* 22, 9244-9254.
155. Ohno F, Watanabe J, Sekihara H, Hirabayashi T, Arata S, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S. (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul. Pept.* 126, 115-122.
156. Oka T, Yoshimura M, Lavandero S, Wada K, Ohba Y. (1991) Control of growth and differentiation of the mammary gland by growth factors. *J. Dairy. Sci.* 74, 2788-2800.
157. Oka H, Jin L, Kulig E, Scheithauer BW, Lloyd RV. (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in a human pituitary adenoma cell line. *Am. J. Pathol.* 155, 1893-1900.
158. Onda K, Yamaguchi M, Ohashi M, Sato R, Ochiai H, Iriki T, Wada Y. (2010) Modification of the analysis of parathyroid hormone-related protein in milk and concentrations of this protein in commercial milk and milk products in Japan. *J. Dairy Sci.* 93, 1861-1867.
159. Onoue S, Hanato J, Yamada S. (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuates streptozotocin-induced apoptotic death of RIN-m5F cells through regulation of Bcl-2 family protein mRNA expression. *FEBS J.* 22, 5542-5551.
160. Onoue S, Ohmori Y, Endo K, Yamada S, Kimura R, Yajima T. (2004) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuate the cigarette smoke extract-induced apoptotic death of rat alveolar L2 cells. *Eur. J. Biochem.* 271, 1757-1767.
161. Ormandy CJ, Naylor M, Harris J, Robertson F, Horseman ND, Lindeman GJ, Visvader J, Kelly PA. (2003) Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice. *Recent. Prog. Horm. Res.* 58, 297-323.
162. Perkin MR, Strachan DP. (2006) Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J. Allergy. Clin. Immunol.* 117, 1374-81.
163. Peroni DG, Piacentini GL, Bodini A, Pigozzi R, Boner AL. (2009) Transforming growth factor-beta is elevated in unpasteurized cow's milk. *Pediatr. Allergy. Immunol.* 20, 42-44.

164. Phillips K, Park MA, Quarrie LH, Boutinaud M, Lochrie JD, Flint DJ, Allan GJ, Beattie J. (2003) Hormonal control of IGF-binding protein (IGFBP)-5 and IGFBP-2 secretion during differentiation of the HC11 mouse mammary epithelial cell line. *J. Mol. Endocrinol.* 31, 197-208.
165. Pinho MS, Gulbenkian S. (2007) Innervation of the canine mammary gland: an immunohistochemical study. *Histol. Histopathol.* 22, 1175-1184.
166. Pirger Z, László Z, Kemenes I, Tóth G, Reglodi D, Kemenes G. (2010) A homolog of the vertebrate pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is both necessary and instructive for the rapid formation of associative memory in an invertebrate. *J. Neurosci.* 30, 13766-13773.
167. Pisegna JR, Wank SA. (1993) Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6345–6349.
168. Porter TE, Frawley LS. (1991) Stimulation of prolactin cell differentiation in vitro by a milk-borne peptide. *Endocrinology.* 129, 2707-2713.
169. Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. (2007) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 115-123.
170. Read LC, Francis GL, Wallace JC, Ballard FJ. (1985) Growth factor concentrations and growth-promoting activity in human milk following premature birth. *J. Dev. Physiol.* 7, 135-145.
171. Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24, 536-547.
172. Reglődi D, Tamás A, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I. (2004) Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul. Pept.* 123, 85-94.
173. Reglődi D. (2009) A PACAP neuroprotektív és általános citoprotektív hatásainak vizsgálata in vitro és in vivo modellekben. MTA Doktori értekezés. Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Intézet, Pécs.
174. Reglődi D, Gyarmati J, Ertl T, Börzsei R, Bódis J, Tamás A, Kiss P, Csanaky K, Bánki E, Bay C, Németh J, Helyes Z. (2010) Alterations of pituitary adenylate cyclase-

- activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J. Endocrinol. Invest.* 33, 443-445.
175. Reglódi D, Tamás A, Koppán M, Szógyi D, Welke L. (2012) Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level - Recent Advances. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 3, 155.
176. Rékási Z, Varga JL, Schally AV, Plonowski A, Halmos G, Csernus B, Armatis P, Groot K. (2001) Antiproliferative actions of growth hormone-releasing hormone antagonists on MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells involve cAMP independent pathways. *Peptides*. 22, 879-886.
177. Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EB, May V. (2011) Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*. 470, 492-497.
178. Reubi JC, Läderach U, Waser B, Gebbers JO, Robberecht P, Laissue JA. (2000) Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer. Res.* 60, 3105-3112.
179. Reubi JC, Zimmermann A, Jonas S, Waser B, Neuhaus P, Laderach U, Wiedenmann B. (1999) Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut*. 45, 766-774.
180. Ribeiro KD, Dimenstein R. (2004) Foremilk and hindmilk retinol levels. *Rev. Panam. Salud. Publica.* 16, 19-22.
181. Rings EH, Grand RJ, Büller HA. (1994) Lactose intolerance and lactase deficiency in children. *Curr. Opin. Pediatr.* 6, 562-567
182. Robberecht P, Waelbroeck M, Noyer M, Chatelain P, De Neef P, König W, Christophe J. (1982) Characterization of secretin and vasoactive intestinal peptide receptors in rat pancreatic plasma membranes using the native peptides, secretin (7-27) and five secretin analogues. *Digestion*. 23, 201-210.
183. Robberecht P, Woussen-Colle MC, Vertongen P, De Neef P, Hou X, Salmon I, Brotchi J. (1994) Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors in human glial cell tumors. *Peptides*. 15, 661-665.
184. Robberecht P, Vertongen P, Velkeniers B, de Neef P, Vergani P, Raftopoulos C, Brotchi J, Hooghe-Peters EL, Christophe J. (1993) Receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptides in human pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1235-1239.

185. Romanelli F, Fillo S, Isidori A, Conte D. (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates rat Leydig cell function in vitro. *Neuropeptides*. 31, 311-317.
186. Sabbadin S, Seraglia R, Allegri G, Bertazzo A, Traldi P. (1999) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in evaluation of protein profiles of infant formulae. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 13, 1438-1443.
187. Said SI, Mutt V. (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*. (Wash DC) 169, 1217-1218.
188. Savino F, Petrucci E, Lupica MM, Nanni GE, Oggero R. (2011) Assay of ghrelin concentration in infant formulas and breast milk. *World J. Gastroenterol.* 17, 1971-1975
189. Sawangjaroen K, Curlewis JD. (1994) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on prolactin, luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 6, 549-555.
190. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 347, 669-671.
191. Schomerus E, Poch A, Bunting R, Mason WT, McArdle CA. (1994) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the pituitary: activation of two signal transduction pathways in the gonadotrope-derived alpha T3-1 cell line. *Endocrinology*. 134, 315-323.
192. Schramek D, Sigl V, Penninger JM. (2011) RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis. *Trends. Endocrinol. Metab.* 22, 188-194.
193. Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Höllt V, Schulz S. (2004) Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin. Cancer. Res.* 10, 8235-8242.
194. Shah GV, Kacsóh B, Seshadri R, Grosvenor CE, Crowley WR. (1989) Presence of calcitonin-like peptide in rat milk: possible physiological role in regulation of neonatal prolactin secretion. *Endocrinology*. 125, 61-67.
195. Sheward WJ, Lutz EM, Copp AJ, Harmar AJ. (1998) Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA during development of the mouse embryo. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 109, 245-253.
196. Shioda S, Legradi G, Leung WC, 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, 818–825.
197. Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. (1988) Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 17, 6528–6532.
198. Shuto Y, Somogyvári-Vigh A, Shioda S, Onda H, Arimura A. (1995a) Effect of hypophysectomy on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression in the rat testis. *Peptides*. 16, 1039-1044.
199. Shuto Y, Somogyvári-Vigh A, Onda H, Arimura A. (1995b) Effect of hypophysectomy on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene expression in the rat hypothalamus. *Peptides*. 16, 407-413.
200. Skaar TC, Baumrucker CR. (1993) Regulation of insulin-like growth factor binding protein secretion by a murine mammary epithelial cell line. *Exp. Cell. Res.* 209, 183-188.
201. Skakkebaek M, Hannibal J, Fahrenkrug J. (1999) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat mammary gland. *Cell. Tissue. Res.* 298, 153-159.
202. Sokolov AV, Pulina MO, Zakharova ET, Susorova AS, Runova OL, Kolodkin NI, Vasilyev VB. (2006) Identification and isolation from breast milk of ceruloplasmin-lactoferrin complex. *Biochemistry (Mosc)*. 71, 160-166.
203. Somogyvári-Vigh A, Reglódi D. (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.* 10, 2861-2889.
204. Sotomayor S, Carmena MJ, Schally AV, Varga JL, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Bajo AM. (2007) Transactivation of HER2 by vasoactive intestinal peptide in experimental prostate cancer: Antagonistic action of an analog of growth-hormone-releasing hormone. *Int. J. Oncol.* 31, 1223-1230.
205. Spitzer E, Zschiesche W, Binas B, Grosse R, Erdmann B. (1995) EGF and TGF alpha modulate structural and functional differentiation of the mammary gland from pregnant mice in vitro: possible role of the arachidonic acid pathway. *J. Cell. Biochem.* 57, 495-508.
206. Starvaggi Cucuzza L, Motta M, Miretti S, Macchi E, Martignani E, Accornero P, Baratta M. (2010) Positive effect of silymarin on cell growth and differentiation in bovine and murine mammary cells. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 94, 111-117.

207. Steenstrup BR, Jørgensen JC, 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. *Regul. Pept.* 61, 197-204.
208. Sternlicht MD, Sunnarborg SW, Kouros-Mehr H, Yu Y, Lee DC, Werb Z. (2005) Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development.* 132, 3923-3933.
209. Suzuki R, Arata S, Nakajo S, Ikenaka K, Kikuyama S, Shioda S. (2003) Expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC1-R) in reactive astrocytes. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 115, 10-20.
210. Szántó Z, Sárszegi Z, Reglődi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Bánki E, Csanaky K, Gaszner B, Pintér O, Szalai Z, Tamás A. (2012) PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J. Mol. Neurosci.* 48, 667-73.
211. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Sone M, Itoi K, Hayashi Y, Ohi R, Mouri T. (1993a) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Regul. Pept.* 49, 19-24.
212. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Sone M, Itoi K, Miura Y, Mouri T (1993b) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in pheochromocytomas. *Peptides.* 14, 365-369.
213. Takahata Y, Takada H, Nomura A, Nakayama H, Ohshima K, Hara T. (2003) Detection of interferon-gamma-inducible chemokines in human milk. *Acta Paediatr.* 92, 659-665.
214. Takeyama M, Wakayama K, Takayama F, Kondo K, Fujii N, Yajima H. (1990) Micro-enzyme immunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactive substance in bovine milk. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 38, 960-962.
215. Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. (2006) Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann. NY Acad. Sci.* 1070, 570-574.
216. Tamás A, Reglődi D, Farkas O, Kövesdi E, Pál J, Povlishock JT, Schwarcz A, Czeiter E, Szántó Z, Dóczy T, Büki A, Bukovics P. (2012) Effect of PACAP in Central and Peripheral Nerve Injuries. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8430-8448.
217. Tams JW, Johnsen AH, Fahrenkrug J. (1999) Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide1-38-binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. *Biochem. J.* 341, 271-276.
218. Tan YV, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, Gomariz RP, Leceta J, Waschek JA. (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of

- Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 2012-2017.
219. Tanneau GM, Hibrand-Saint Oyant L, Chevaleyre CC, Salmon HP. (1999) Differential recruitment of T- and IgA B-lymphocytes in the developing mammary gland in relation to homing receptors and vascular addressins. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1581-1592.
220. Tohei A, Matsuzaki M, Kogo H. (2001) Antagonist of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide suppresses prolactin secretion without changing the activity of dopamine neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology.* 73, 68-74.
221. Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J, Szabó N, Tóth E, Kincses ZT, Vécsei L, Tajti J. (2013) Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia.* 33, 1085-1095.
222. Uchida D, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Shioda S, Banks WA. (1996) Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain. Res.* 736, 280-286.
223. Uddman R, Luts A, Absood A, Arimura A, Ekelund M, Desai H, Håkanson R, Hambreaus G, Sundler F. (1991a) PACAP, a VIP-like peptide, in neurons of the esophagus. *Regul. Pept.* 36, 415-422.
224. Uddman R, Luts A, Arimura A, Sundler F. (1991b) Pituitary adenylate cyclaseactivating peptide (PACAP), a new vasoactive intestinal peptide (VIP)-like peptide in the respiratory tract. *Cell. Tissue. Res.* 265, 197-201
225. Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology.* 135, 2662-2680.
226. Valdehita A, Bajo AM, Schally AV, Varga JL, Carmena MJ, Prieto JC. (2009) Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces transactivation of EGFR and HER2 in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302, 41-48.
227. Vallejo I, Vallejo M. (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces astrocyte differentiation of precursor cells from developing cerebral cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 671-683.
228. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H. (1999) Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 9415-9420.

229. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fournier A, Vaudry H. (2000a) PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Ann. NY. Acad. Sci.* 921, 293-299.
230. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. (2000b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.
231. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61, 283-357.
232. Vaudry H, Arimura A. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide.* (2003) Kluwer Academic Publisher. Massachusetts, USA, 165-167.
233. Vincze A, Reglödi D, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Abrahám H. (2011) Role of endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in myelination of the rodent brain: lessons from PACAP-deficient mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 923-935.
234. Vincze E, Köves K. (2001) A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésekben. *Orvosi Hetilap* 142: 491-496.
235. Wada Y, Nakamachi T, Endo K, Seki T, Ohtaki H, Tsuchikawa D, Hori M, Tsuchida M, Yoshikawa A, Matkovits A, Kagami N, Imai N, Fujisaka S, Usui I, Tobe K, Koide R, Takahashi H, Shioda S. (2013) PACAP attenuates NMDA-induced retinal damage in association with modulation of the microglia/macrophage status into an acquired deactivation subtype. *J. Mol. Neurosci.* 51, 493-502.
236. Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD. (2005) PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett.* 2005 579, 4005-4011.
237. Waschek JA. (2002) Multiple actions of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev. Neurosci.* 24, 14-23.
238. Watson CJ, Burdon TG. (1996) Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Rev. Reprod.* 1, 1-5.
239. Watson CJ, Oliver C.H, Khaled WT. (2011) Cytokine signalling in mammary gland development. *J. Reprod. Immunol.* 88, 124-129.
240. Weaver LT. (1992) Breast and gut: the relationship between lactating mammary function and neonatal gastrointestinal function. *Proc. Nutr. Soc.* 51, 155-163.

241. Wells JCK. (1996) Nutritional considerations in infant formula design. *Seminars in Neonatology*. 1, 19-26.
242. Werner H, Koch Y, Fridkin M, Fahrenkrug J, Gozes I. (1985) High levels of vasoactive intestinal peptide in human milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 228-232.
243. Wilson GS. (1943) The Pasteurization of Milk. *Br. Med. J.* 1, 261-262.
244. Winsell J, Ahren B. (2007) Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides*. 28: 1805-181.
245. Wynick D, Small CJ, Bacon A, Holmes FE, Norman M, Ormandy CJ, Kilic E, Kerr NC, Ghatei M, Talamantes F, Bloom SR, Pachnis V. (1998) Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 12671-1276.
246. Xiao X, Xiong A, Chen X, Mao X, Zhou X. (2002) Epidermal growth factor concentrations in human milk, cow's milk and cow's milk-based infant formulas. *Chin. Med. J. (Engl)*. 115, 451-454.
247. Yamamoto M, Fisher JE, Thiede MA, Caulfield MP, Rosenblatt M, Duong LT. (1992) Concentrations of parathyroid hormone-related protein in rat milk change with duration of lactation and interval from previous suckling, but not with milk calcium. *Endocrinology*. 130, 741-747.
248. Yoshioka Y, Kudo S, Nishimura H, Yajima T, Kishihara K, Saito K, Suzuki T, Suzuki Y, Kuroiwa S, Yoshikai Y. (2005) Oral administration of bovine colostrum stimulates intestinal intraepithelial lymphocytes to polarize Th1-type in mice. *Int. Immunopharmacol.* 5, 581-590.
249. Zhong Y, Kasson BG. (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 135, 207-213.
250. Zhou WL, Leung PS, Wong TP, Dun NJ, Wong PY, Chan HC. (1997) Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J. Endocrinol.* 154, 389-395.
251. Zia H, Hida T, Jakowlew S, Birrer M, Gozes Y, Reubi JC, Fridkin M, Gozes I, Moody TW. (1996) Breast cancer growth is inhibited by vasoactive intestinal peptide (VIP) hybrid, a synthetic VIP receptor antagonist. *Cancer Res.* 56, 3486-3489.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények

- **Csanaky K**, Doppler W, Tamás A, Kovács K, Tóth G, Reglődi D. (2014) Influence of terminal differentiation and PACAP on the cytokine, chemokine and growth factor secretion of mammary epithelial cells. *J. Mol. Neurosci.* 52, 28-36. **IF: 2,891**
- **Csanaky K**, Reglődi D, Bánki E, Tarcai I, Márk L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Horváth K, Sántik L, Tamás A. (2013) Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. *Acta. Physiol. Hung.* 100, 28-36. **IF: 0,882**
- **Csanaky K**, Bánki E, Szabadfi K, Reglődi D, Tarcai I, Czeglédi L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Szántó Z, Zapf I, Sipos E, Shioda S, Tamás A. (2012) Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *J. Mol. Neurosci.* 48, 631-637. **IF: 2,891**
- **Csanaky K**, Bánki E, Helyes Z, Börzsei R, Bagoly T, Márk L, Bay C, Gyarmati J, Ertl T, Kiss P, Brubel R, Váczy A, Németh J, Szauer E, Tarcai I, Szalontai B, Heronyányi D, Bilonka Z, Reglődi D, Tamás A. (2012) Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) kimutatása vér- és tejmintákból várandósság szülés és szoptatás alatt. *Védőnő.* 22: 5-8.

7.2. Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

- Reglődi D, Gyarmati J, Ertl T, Börzsei R, Bódis J, Tamás A, Kiss P, **Csanaky K**, Bánki E, Bay C, Németh J, Helyes Z. (2010) Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J. Endocrinol. Invest.* 33, 443-445. **IF: 1,476**
- Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, **Csanaky K**, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur. J. Endocrinol.* 160, 561-565. **IF: 3,539**

7.3. Az értekezés témájába közvetlenül nem illeszkedő egyéb közlemények

- Bánki E, Kovács K, Nagy D, Juhász T, Degrell P, **Csanaky K**, Kiss P, Jancsó G, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. (2014) Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *J. Mol. Neurosci.* Közlésre elfogadva
IF: 2,891
- Bánki E, Degrell P, Kiss P, Kovács K, Kemény Á, **Csanaky K**, Düh A, Nagy D, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. (2013) Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides.* 42, 125-130.
IF: 2,522
- Szántó Z, Sárszegi Z, Reglődi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Bánki E, **Csanaky K**, Gaszner B, Pintér O, Szalai Z, Tamás A. (2012) PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J. Mol. Neurosci.* 48, 667-673.
IF: 2,891
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglődi D, Szabó A, Kovács K, Szalontai B, Sétáló G Jr, Bánki E, **Csanaky K**, Tamás A, Gábel R. (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell. Tissue. Res.* 348, 37-46.

IF: 3,677

7.4. Idézhető absztraktok

- Tamás A, **Csanaky K**, Bánki E, Tarcai I, Helyes Zs, Ertl T, Gyarmati J, Márk L, Horváth K, Reglődi D. (2013) Radioimmunoassay examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. *J. Mol. Neurosci.* 51, 198.
- Tamás A, Jávornágyi A, **Csanaky K**, Ragnhildstveit E, Vikjord SA, Sarlós PD, Sárszegi Zs, Zapf I, Szántó Z, Faludi B, Molnár T, Németh J, Bánki E, Lelész B, Réman Gy, Reglődi D. (2013) Examination of PACAP-like immunoreactivity in different pathological clinical samples. *J. Mol. Neurosci.* 51, 207-208.
- Nagy D, Bánki E, **Csanaky K**, Düh A, Kovács K, Kemény A, Kiss P, Tamás A, Degrell P, Szakály P, Jancsó G, Tóth G, Reglődi D. (2013) Examination of the protective effects of PACAP in rat diabetic nephropathy. *J. Mol. Neurosci.* 51, 188-189.

- **Csanaky K**, Doppler W, Tamás A, Kovács K, Tóth G, Reglődi D. (2013) Effect of PACAP on lactogenic hormone induced differentiation of HC11 mouse mammary epithelial cells. *J. Mol. Neurosci.* 51, 224.
- Bánki E, Düh A, Nagy D, **Csanaky K**, Kovács K, Kiss P, Tamás A, Degrell P, Hashimoto H, Reglődi D. (2013) Examination of the role of endogenous PACAP in diabetic nephropathy. *J. Mol. Neurosci.* 51, 208-209.
- Bánki E, Kovács K, Nagy D, Kiss P, Berta G, Degrell P, Szabadfi K, Atlasz T, Juhász T, Tóth G, Tamás A, Düh A, **Csanaky K**, Reglődi D. (2013) Molecular mechanisms underlying the nephro-protective effects of PACAP in diabetes. *J. Mol. Neurosci.* 51, 188.
- Tamás A, Helyes Zs, Börzsei R, Márk L, Bagoly T, Bay Cs, Gyarmati J, Ertl T, Bódis J, **Csanaky K**, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Reglődi D. (2010) PACAP-38 in human plasma and milk under physiological and pathological conditions: introductory measurements for possible future clinical diagnostic application. *J. Mol. Neurosci.* 42, 293-294.
- Szabadfi K, Atlasz T, Bánki E, **Csanaky K**, Kiss P, Reglődi D, Gonezi P, Szabó A, Mester L, Sétáló Gy, Jakab F, Gábrriel R. (2010) Effects of PACAP in streptozotocin-induced rat model of diabetic retinopathy. *J. Mol. Neurosci.* 42, 305.
- Szabadfi K, Bánki E, **Csanaky K**, Kiss P, Reglődi D, Griecs M, Szabó A, Kovács K, Sétáló G, Juhász B, Varga B, Berkics B, Gabriel R, Atlasz T. (2010) Ameliorative potential of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in streptozotocin-induced type I diabetic retinopathy in rats. *Neuropeptides.* 44, 544.
- Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Rácz B, Horváth G, Farkas J, Bánki E, **Csanaky K**, Gaal V, Lubics A, Tamás A, Gábrriel R, Atlasz T. (2010) Review of the retinoprotective effects of PACAP. *J. Mol. Neurosci.* 42, 282-283.
- Kiss P, **Csanaky K**, Bánki E, Tamás A, Börzsei R, Márk L, Bagoly T, Bay C, Váczy A, Horváth G, Németh J, Czeglédi L, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. (2010) Presence of PACAP-38 in mammalian plasma and milk: From guinea pig to humans. *Acta. Physiol. Hung.* 97, 115.

Témához kapcsolódó publikációk impakt faktora: 11,679

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 23,66

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőimnek Reglódi Dóra egyetemi tanárnak és Tamás Andrea egyetemi docensnek, akik támogatták és irányították tudományos tevékenységemet.

Hálás köszönet illeti Wolfgang Doppler egyetemi tanárt, aki lehetőséget biztosított arra, hogy a kísérletek egy jelentős részét az Innsbrucki Egyetem Biokémiai Intézetében végezhettem és munkámhoz, valamint a tézisek összeállításához hasznos tanácsokat adott.

Az értekezésben ismertetett molekulárbiológiai és tömegspektrometriás vizsgálatokban és módszertanuk elsajátításában Márk László és Kovács Krisztina egyetemi docensek, Szabó Alíz egyetemi adjunktus, Maász Gábor és Jámbor Éva PhD hallgatók, Pásztor Anna Irma szakasszisztens, az immuhisztokémiai és immuncitokémiai vizsgálatokban Szereday László egyetemi docens, Czeglédi Levente egyetemi adjunktus, Balogh András egyetemi tanársegéd, Szabadfi Krisztina tudományos munkatárs, Zapf István klinikai orvos és Koloszar Ibolya szakasszisztens, a RIA vizsgálatokban pedig Helyes Zsuzsanna egyetemi tanár és Bagoly Teréz szakasszisztens voltak segítségemre.

Köszönettel tartozom az anyatejminták gyűjtésében nyújtott fáradozásukért a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársainak, valamint a Pécsi Egyesített Egészségügyi Intézmények védőnőinek.

A vizsgálatok egy részének technikai kivitelezésére a PTE Biokémiai és Orvosi Kémiai, és Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében történt, ezért köszönetemet fejezem ki Sümegi Balázs és Berki Tímea egyetemi tanároknak.

TDK-s hallgatóként Bede Brigitta vett közvetlenül részt a kísérletes munkában.

A dolgozat előbírálata kapcsán nyújtott kritikai észrevételekért köszönet illeti Ábrahám István és Veres Balázs egyetemi docenseket, valamint Pétervári Erika egyetemi adjunktust.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Bánki Eszter PhD-hallgatónak, akivel egyetemistaként közösen dolgoztunk, és aki az ismertetett vizsgálatok megvalósításában is segített.

Támogatók: OTKA (K72592; K73044; K104984; CNK78480), TAMOP (4.2.1.B-10/2/KONV-2010-002; 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007; 4.2.2.B-10/1-2010-0029; 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0024; Apáczai Csere János ösztöndíj: TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001), Arimura Foundation, PTE ÁOK Research Grant (KA-34039/10-10; KA-34039/10-26), PTE-MTA “Lendület”, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, Richter Foundation.

9. MELLÉKLET

Kérdőív

Név:

Cím:

Elérhetőség (telefon, e-mail):

Életkor:

Jelenleg szoptatott gyermek(ek) életkora:

Gyermek neve:

Hányadik hétre született gyermeke?

Van-e gyermekének veleszületett vagy szerzett betegsége (ha igen a betegség rövid leírása)?

Volt-e valami komplikáció terhesség vagy szülés során?

Milyen gyakran szoptatja gyermekét, egy-egy alkalommal mennyit szopik gyermeke?

Van-e valami olyan tényező, amely nehezíti a szoptatást (sebes emlőbimbó, emlőgyulladás stb.)?

Az anyatej mellett mással is táplálja-e gyermekét, ha igen mivel (tápszer neve, egyéb élelmiszerek), mi az anyatej és egyéb élelmiszerek aránya a táplálkozásban?

Mi jellemző az Ön táplálkozására (kiegyensúlyozott, vegetáriánus, diéta stb.)?

Fogyaszt-e valamilyen táplálék kiegészítőt?

Szed-e valamilyen gyógyszert (terhes vitamin, fogamzásgátló, stb.)?

Milyen gyógyszereket fogyasztott terhesség alatt?

Fogyaszt-e kávé, alkoholt, drogot?

További gyermekek kora és neme:

Korábbi gyermekek szoptatásának rövid leírása (mennyi ideig szoptak, hozzátáplálás ideje, koraszülés, veleszületett vagy szerzett betegség):

Beleegyző nyilatkozat

Alulírott kijelentem, hogy a kellő mértékű tájékoztatás birtokában beleegyezésemet adom az anyatejem tudományos kutatási célú felhasználására. A tudományos munka célja egy emberben még kevésbé ismert fehérjetermészetű anyag (PACAP) tejben mérhető mennyiségének meghatározása.

A beleegyezésemet önkéntesen adom, adataim és vizsgálati eredményeim az orvosi titoktartás alá esnek. Tisztában vagyok azzal, hogy a beleegyezésemet bármikor visszavonhatom. Beleegyezésem visszavonása esetén adataimat törlik és mintáimat megsemmisítik.

.....

Nagyon köszönjük segítségét!