

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**A MIKOTOXINOK ÉS A FAGYASZTÁS HATÁSA A
PREIMPLANTÁCIÓS EGÉREMBRIÓKRA**

Doktori értekezés tézisei

Somoskői Bence

2018

Témavezetők:

Prof. Dr. Cseh Sándor

tanszékvezető

Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika

Prof. Dr. Kovács Melinda

kutatócsoport vezető

MTA-KE Mikotoxinok az Élelmiszerláncban

Tartalomjegyzék

1. Fusarium mikotoxinok hatása a korai embrionális fejlődésre	4
1.1. Bevezetés	4
1.2. Anyag és módszer	6
1.3. Eredmények megvitatása	7
2. A fagyasztás hatása a kompakt stadium embriókra	9
1.1. Bevezetés.....	9
1.2. Anyag és módszer.....	10
1.3. Eredmények megvitatása	11
Új tudományos eredmények.....	12
Az értekezés alapját képező publikációk	13
Az értekezéshez nem kapcsolódó publikációk	14
Konferencia részvétel (prezentációk és poszterek)	15

1. Fusarium mikotoxinok hatása a korai embrionális fejlődésre

1.1. Bevezetés

A Fusarium mikotoxin Fusarium penészgombák által termelt másodlagos anyagcsere termékek. Ezek a penészgombák a mérsékelt égövön igen széles elterjedtséget mutatnak, és az általuk termelt toxinokat fusariotoxinoknak nevezzük (139 az összesen több mint 300 mikotoxinból). Mind a humán-, mind pedig az állategészségügyben jelentős szereppel bírnak, az általuk okozott károk pedig évente több millió dollárt tesznek ki. Fontos megjegyezni, hogy ezek a toxinok az esetek nagy részében együttesen fordulnak elő. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy bizonyos fajok több toxint is termelnek egyszerre, másrészt pedig egyszerre több Fusarium faj is megtelepedhet egy mintán.

A T-2 számos káros hatásának leírása mellett számtalan tanulmány foglalkozik a toxin reprodukciót érintő káros hatásával, hím és nőivarban egyaránt. Ilyen hatások többek között a petefészek működését érintő jelenségek, amelyeket in vivo és in vitro tanulmányok is alátámasztanak. A T-2-vel szennyezett takarmány elfogyasztása a tüszőérés és az ovuláció késleltetését, és a luteinizáció zavarát idézheti elő. A toxint kapcsolatba hozták a granulosa sejtek proliferációjának gátlásával, valamint a csökkent szteroidogenezissel. Egy közelmúltban publikált tanulmányban a toxin hím nemi működésre kifejtett hatását vizsgálták bak nyulakban. Ebben az találták, hogy az ondóban megnövekedett a morfológiailag nem megfelelő spermiumok aránya, a citromsav koncentráció, valamint csökkent a tesztoszteron termelés is. Ezek a hatások együttesen csökkent fertilitáshoz vagy infertilitáshoz vezethetnek házi állatokban. A T-2 toxin magzatkárosító hatását több tanulmány is említi. A toxin átjut a placentán, ahol fejlődési rendellenességeket idézhet elő, valamint károsíthatja a vér-agy gátat és agyi léziókat okozhat.

A Fumonisin (B1 és B2) egyes Fusarium fajok rákkeltő anyagcsere-termékei. Ezen vegyületek gátolják a szfingolipidek szintézisét a sejtekben, így kifejtve toxikus hatásukat. A legtoxikusabb és leggyakoribb tagjuk a Fumonisin B1 (FB1), amely tumor képződést okozott patkányokban valamint előidézte a lovak leukoenkefalomáciáját és sertések tüdőödémáját. A nőivarú háziállatokra nézve nem sok irodalmi adatot találunk a FB1-gyel kapcsolatban. Egyes szerzők alátámasztják, hogy a toxin negatívan befolyásolja a granulosa sejtek működését, a folliculus fejlődést valamint a petesejtek túlélőképességét és általánosságban megzavarhatja az ovulációt megelőző hormonális folyamatokat. A toxinnak hím nemi működést károsan befolyásoló hatásait is feljegyezték, úgymint csökkent spermium motilitás és kevesebb élő spermium az ejakulátumban.

A széleskörű irodalmi adatok ellenére nincs ismeretünk arra vonatkozóan, hogy a két toxin külön illetve együttes előfordulás esetén milyen hatással van a beágyazódás előtti, korai embrionális fejlődésre.

A dolgozat első részének célkitűzései:

1. Korai (preimplantációs) embrionális fejlődés vizsgálata különböző T-2 koncentrációk mellett (1. kísérlet)
2. T-2 hatásának vizsgálata a preimplantációs embriók fejlődési potenciáljára és kromatinállományára (2. kísérlet)
3. Preimplantációs embriófejlődés vizsgálata különböző T-2 expozíciós idők alkalmazása mellett (3. kísérlet)
4. T-2 + Fumonisin B1 szennyezettség hatásának vizsgálata a preimplantációs fejlődésre (4. kísérlet)

1.2. Anyag és módszer

Az embriók előállítása és kinyerése minden kísérletben a következőképpen történt: 6 hetes egereket 12 óra sötét/12 óra világos fényprogram és 21 °C mellett tartottunk az állatházban. A szuperovuláltatott (1. nap: 7.5 IU eCG ip.; 3. nap: 7.5 IU hCG ip.) nőstény egereket a hCG beadását követően egy éjszakára egyedileg hímekhez helyeztük. A zigótákat a párázást követő reggelen nyertük ki az állatokból, majd kimosás után pool-oztuk és véletlenszerűen kezelési csoportokba osztottuk. A különböző kezelési csoportok a toxint eltérő koncentrációban tartalmazták. A csoportosítást követően az embriókat in vitro tenyésztettük 96 óráig, 37.5 °C-on, 6.5% Co₂ koncentráció mellett, maximális páratartalommal.

1. kísérlet: a tenyésztő mediumok a következő T-2 koncentrációkat tartalmazták: 0.1; 0.5; 1.0; 1.25; 1.5; 1.75; 2.0; 2.5 és 3 ng/ml. A vizsgálat paraméterek a fejlődési potenciál, mitokondrium aktivitás, elrendeződés valamint a reaktív oxygen gyökök (ROS) képződése volt
2. kísérlet: a korai embrionális fejlődést valamint a blasztociszták minőségét vizsgáltuk egy szűkebb T-2 koncentráció-tartományban: 0.5, 0.75 és 1 ng/ml
3. kísérlet: különböző expozíciós időket alkalmaztunk az előző kísérletben alkalmazott koncentrációk mellett: 96 óra (Kezelés I) és 24 óra (Kezelés II). Az embriókat morfológiailag vizsgáltuk, meghatároztuk a különböző fejlettségű blasztociszták arányát, valamint a mikronukleuszok arányát (kromatin sérülés és a sejtszámot (SYBR Green és propidium-jodid festéssel). A vizsgálatokba csak a morfológiailag normálisnak ítélt embriókat vontuk be.
4. kísérlet: ebben az esetben háromféle kezelést alkalmaztunk: alacsony dózisú T-2 (0.5 ng/ml), szimpla FB1 dózisok (1, 2 és 10 ng/ml) valamint kombinált dózisok (0.5 ng/ml T-2 + 1, 2 vagy 10 ng/ml FB1). A vizsgált paraméterek a 3. kísérletben ismertetettek voltak.

1.3. Eredmények megvitatása

Eredményeink azt mutatják, hogy az alacsony T-2 koncentráció mellett az embriók nagy része elérte a blasztociszta stádiumot, és a 0.5 ng/ml koncentráció nem okozott eltérést a kontrollhoz képest sem a mitokondrium aktivitásban, elrendeződésben, sem pedig a ROS termelésben. A normál embriófejlődés során a blasztomerek perikortikális és perinukleáris – heterogén – elrendeződést mutatnak. A 2.5 ng/ml koncentráció mellett tenyésztett embriók kétsejtes stádiumban megrekedtek és homogén, diffúz mitokondrium eloszlást mutattak.

Annak ellenére, hogy az alacsony T-2 koncentráció (0.5 ng/ml) mellett a blaszociszta arány nem változott a kontrollhoz képest, a kezelés mintegy 24 órás eltolódást okozott a blasztocöl képződésben.

A mikronukleuszok a kromatinról vagy osztódási orsóról levált kis fragmentumok, amelyek genotoxikus anyagok hatására keletkezhetnek. Eredményeink azt mutatják, hogy a morfológiailag normálisnak ítélt embriók toxin kezelés hatására mikronukleuszokat tartalmazhatnak. Ezeknek a megnövekedett száma implantációs nehézségeket okozhat.

A normál morfológiájú blasztociszták mind 72, mind pedig 96 órás tenyésztést követően alacsonyabb sejtszámot produkáltak (Kezelés I: 0.5 ng/ml, 0.75 ng/ml és 1 ng/ml T-2), mint a kontroll csoport embriói. A sejtszám jó előrejelzője a fejlődési képességnek, így a csökkent blasztomer szám csökkent fejlődési potenciált vetít elő. A kontroll tápfolyadékban tenyésztett embriók áthelyezése toxinos tápfolyadékba (Kezelés II) a kontrollhoz képest alacsonyabb blasztomer számot eredményezett. A sejtszámbeli különbséget megtaláltuk a Kezelés I és II embriói között is, igaz, ez a különbség nem volt szignifikáns (kivéve az 1 ng/ml-es csoportot, azonban ott gyenge szignifikanciát találtunk ($p=0.048$) magas szórással).

A blasztocöl expanszió mértéke megmutatja a blasztociszta stádium embriók érettségét, fejlettségét. Ez azért fontos, mert egerekben az ún. implantációs ablak – tehát amikor az embriónak lehetősége van beágyazódni – rendkívül rövid, mindössze 24 óra (a 4. nap körül, in vivo). Ez tehát azt jelenti, hogy ha az embrió nem éri el a megfelelő fejlettséget erre az időpontra, a beágyazódás nem lehetséges. Eredményeink azt mutatják, hogy a 96 óráig toxinos tápfolyadékban tenyésztett embriók (Kezelés I) kisebb arányban érik el a késői, érett blasztociszta stádiumokat (expandált és kibújt) mint a kontroll vagy a Kezelés II embriói. Továbbá, a 0.5 és 1 ng/ml csoportoknál nem találtunk kibújt blasztocisztát a Kezelés I-ben.

Összességében elmondható tehát, hogy a T-2 mikotoxin befolyásolja a korai embrionális fejlődést, de a hatás függ az expozíciós időtől. A 96 órás kezelés esetén normál kromatin minőséget találtunk, alacsonyabb fejlődési potenciállal. Ezzel szemben a 24 órás kezelés

blasztocisztái nagyobb arányú kromatinsérülést, de a kontrollal megegyező fejlődési potenciált mutattak. Mindkét esetben azonban csökkent mitotikus rátát találtunk, ami kevesebb sejtszámot eredményezett.

A 4. kísérletben a T-2 és FB1 mikotoxinok hatását vizsgáltuk, külön-külön és kombinált dózisokban. A blasztociszta arányt egyik toxin szimpla dózisa sem befolyásolta, ezzel szemben a kombinált kezelés radikálisan csökkentette azt. Ebben az esetben a két toxin szinergista hatását detektáltuk.

Mindkét toxinnal való kezelés csökkentette a blasztociszták sejtszámát. A T-2 kezelés jobban, míg a FB1 kezelés kevésbé volt hatással erre a paraméterre. A kombinált dózisok azonban az alacsony T-2 koncentráció által kiváltott sejtszám csökkenést eredményezték.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a két toxin külön-külön nem befolyásolta az egérembriók fejlődési potenciálját, de az együttes előfordulásuk szinergista negatív hatást eredményezett (blasztociszta arány és blasztocöl expanzió). Ezen kívül mindegyik kezelés csökkentette a sejtszámot.

2. A fagyasztás hatása a kompakt stadium embriókra

2.1. Bevezetés

Az utóbbi néhány évtizedben a fagyasztva tárolási protokollok hatalmas fejlődésen mentek keresztül. Ez a fejlődés több területre is kiterjedt, legmarkánsabban azonban a reprodukív medicinát érintette. Az első sikeres spermafagyasztást követően lehetővé vált az embriók fagyasztva tárolása is, ami napjainkra szerves részét képezi az asszisztált reprodukív eljárásoknak mind a human egészségügyben mind pedig az állatorvoslásban. A kiroprezerváció (CP) egy olyan folyamat, amelyben a biológiai minták rendkívül alacsony hőmérsékleten tárolódnak, és minden anyagcsere folyamat megáll, ezáltal a minták hosszú ideig minőségromlás nélkül tárolhatók. A morfológiai és méretbeli különbségek ellenére a különböző fajok embriói rendszerint két fagyasztási módszerrel tárolhatók: programozott lassú fagyasztás (SF) és az ultragyors vitrifikáció (VF). Napjainkban is éles vita folyik arról, hogy a két fagyasztási módszer közül melyik a hatékonyabb illetve milyen krioprotektív anyagok a legjobban használhatók. Az embrió CP bevezetése a gyakorlatba csökkentette friss embriók beültetését, és maximálta az IVF ciklusok hatékonyságát valamint növelte azok kiszámíthatóságát és javította a végkimenetelüket. NEM kérdés tehát, hogy a módszer növeli a klinikák hatékonyságát, és előnyösen befolyásolják a terhességi és születési rátát is, akár egy IVF ciklust követően is.

A dolgozat második részének célkitűzései:

1. Vitrifikáció hatásának vizsgálata különböző fejlődési stádiumú embriókra (2/16 sejtestől blasztocisztáig) (5. kísérlet)
2. Vitrifikáció és lassú fagyasztás hatásának vizsgálata morula és blasztociszta embriókra (6. kísérlet)

2.2. Anyag és módszer

Az embriók előállítása és kinyerése az 1. fejezetben megadottak szerint történt.

A vitrifikációt (VF) az ún. VitroLoop technikával végeztük, 2 lépcsőben, krioprotektív anyagként pedig etilén-glikolt (EG) és propilén-glikolt (PG) alkalmaztunk. Minden munkafolyamatot 37 °C-on végeztünk, melegítő tárgyasztalon. Az embriók felolvasztása szintén 37 °C-on történt, majd 3 lépésben, csökkenő szukróz koncentráció mellett távolítottuk el a krioprotektív anyagokat.

Programozott lassú fagyasztás (SF): Az embriókat 10% glicer tartalmú DPBS-ben ekvilibráltuk 10-15 percig, ezt követően szívtuk fel a szalmákba (5 embrió/szalma). A műszalmákat ezt követően Planer fagyasztógépbe helyeztük, -7 °C-ra. 10 perces várakozás után egy előre behűtött csipesszel végeztük el a seeding lépését, majd a mintát 0.3 °C/perc sebességgel hűtöttük -30 °C-ra, majd folyékony nitrogénbe helyeztük. A felolvasztás 25 °C-on történt, majd a krioprotektív anyagokat 4 lépésben, csökkenő glycerol és szukróz koncentráció mellett végeztünk.

A mitokondriumok és a reaktív oxygen gyökök festését MitoTracker Orange CMTM Ros illetve 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate festékekkel végeztük. A kromatin állomány elemzéséhez 2.5 µg/ml Hoechst 33258 festéket használtunk 3:1 (v/v) glycerol/PBS-ben oldva.

A következő paraméterek vizsgálatához Nikon C1/TE2000-U laser scanning konfokális mikroszkópot használtunk: mitokondriumok aktivitása és eloszlása, ROS termelődés és eloszlás sejten belül, mitokondrium/ROS kolokalizáció. Az adatelemzést EZ-C1 Gold Version 3.70 software-rel végeztük.

2.3. Eredmények megvitatása

Az 5. kísérletben a vitrifikáció kis mértékben érintette az embriók morfológiáját, ami a kismértékű fragmentációt (<20%) tartalmazó embriók magasabb arányában mutatkozott meg. A vitrifikáció alkalmazása kis mértékben növelte a kromatin töredezettséget, igaz, főleg az átmeneti stádiumokban (morula). Mind a morula, mind a blasztociszta stadium embriókban a friss embriókhoz képest megemelkedett ROS produkciót találtunk.

A 6. kísérletben a VF és SF hatásait hasonlítottuk össze. Adatink azt mutatják, hogy mindkét technika csökkenti a grade A embriók (<20% blasztomer tartalmaz mikronukleuszt) arányát, maga a fagyasztás tehát befolyásolja a kromatin állomány épségét. A mikronukleusz arány magasabb volt SF esetén, mint VF alkalmazásakor, ami 60%-os grade A embrió arányt eredményezett szemben a SF 32%-os arányával ($P < 0.0001$). Továbbá, a lassú fagyasztás által előidézett kromatin sérülés kifejezettebb volt a morula embriókban, mint a blasztocisztákban (16% vs. 61% grade A, $P < 0.001$). Mindkét fagyasztási eljárás csökkentette azon embriók számát, amelyek heterogén mitokondrium mintázatot mutattak. A csökkentés mértéke függött az embriók minőségétől, és a legkifejezettebb a grade C embriókban volt (>20% blasztomer tartalmaz mikronukleuszt. A mitokondriumok aktivitása szintén csökkenést mutatott a vitrifikált és lassú fagyasztott morulákban, a friss embriókhoz viszonyítva.

Eredményeinket összegezve elmondható, hogy a morula stádiumú embriók kevésbé tolerálták a fagyasztással járó stresszt, mint a blasztociszták.

Új tudományos eredmények

- Igazoltuk, hogy a preimplantációs egémbriók használata kellően érzékeny in vitro modellt biztosít toxin hatás-vizsgálatokhoz.
- A T-2 LOAEL értékét ebben a rendszerben (0.5-0.75-1 ng/ml koncentráció tartományban) 0.75 ng/ml-ben állapítottuk meg. 0.5 ng/ml T-2 mellett megfelelő blasztociszta arány ellenére is késleltetett fejlődést találtunk.
- Igazoltuk, hogy az eltérő T-2 expozíciós idő eltérő blasztociszta minőséget eredményez. A különbség a kromatin állományban és a fejlettségben mutatkozik meg.
- Elsőként vizsgáltuk a T-2 és FB1 együttes hatását korai egémbriókon.
- Igazoltuk, hogy mind a lassú fagyasztás, mind a vitrifikáció alkalmas technológia az embriók fagyasztva tárolására. Az embriókra kifejtett hatásuk azonban különböző, amely megmutatkozott a kromatin állományban, ROS termelésben és a mitokondriumok elrendeződésében. Összességében a vitrifikáció alkalmasabbnak tűnik ezen paraméterek alapján, a legmegfelelőbb stádium pedig a blasztociszta. Továbbá igazoltuk hogy a heterogén mitokondrium elrendeződés magasabb energia stgátusszal jár együtt.
- Első alkalommal vizsgáltuk a kromatin állomány minőségét és a mitokondriumok elrendeződését, aktivitását együttesen, egémbriók fagyasztása esetén.

Az értekezés alapját képező publikációk

- Somoskői B, Keresztes Z, Solti L, Kovács M and Cseh S (2012) A T-2 mikotoxin hatása egérembriók korai fejlődésére. Effect of T-2 mycotoxin on early development of mouse embryos. *Hungarian Veterinary Journal* 10: 614–619. **(IF: 0.189)**
- Martino N, Dell’Aquila M, Cardone R, Somoskői B, Lacalandra GM and Cseh S. (2013) Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology* 11(27). **(IF: 2.849)**
- Somoskői B, Martino N, Cardone R, Lacalandra GM, Dell’Aquila M and Cseh S. (2015) Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13(22). **(IF: 2.849)**
- Somoskői B, Kovács M and Cseh S (2016) Effects of T-2 mycotoxin on in vitro development and chromatin status of mouse embryos in preimplantation stages. *Toxicology and Industrial Health* 32: 1260–1265. (first publication online: 2014) **(IF: 1.378)**
- Somoskői B, Kovács M and Cseh S (2016) T-2 mycotoxin slows down the development of mouse blastocysts, decreases their blastomere number and increases chromatin damage. *Acta Veterinaria Hungarica* 64(3): 390–400. **(IF: 0.814)**
- Somoskői B, Kovács M and Cseh S (2017) Effects of T-2 and Fumonisin B1 combined treatment on in vitro mouse embryo development and blastocyst quality. *Manuscript submitted to Toxicology and Industrial Health*.

Az értekezéshez nem kapcsolódó publikációk

Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B and Cseh S. (2014) Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/307268> (IF: **2.476**)

Kanyó K, Zeke J, Kriston R, et al. (2016) The impact of laser-assisted hatching on the outcome of frozen human embryo transfer cycles. *Zygote* 24: 742–747. (IF: **1.053**)

Reglodi D, Cseh S, Somoskői B, Fulop B, Szentleleky E, Szegeczki V, Kovacs A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, Tamas A, Bardosi A, Manavalan S, Bako E, Zakany R, Juhasz T (2017). Disturbed spermatogenic signaling in PACAP deficient mice. *Reproduction*. Published online before print November 3, 2017, doi: 10.1530/REP-17-0470 (IF: **3.100**)

Konferencia részvétel (prezentációk és poszterek)

Judit Szabó-Fodor, Mariam Lilia Kachlek, András Szabó, Zsófia Blochné Bodnár, Dóra Hafner, Gábor Tornay, Sándor Cseh, Bence Somoskői, Melinda Kovács. Individual and combined effect of Fusarium toxins in vivo. In: 37th Mycotoxin Workshop: Conference Abstracts . 164 p. Bratislava , Szlovákia , 2015.06.01 -2015.06.03. Paper P84. 1 p.

Somoskői Bence, Kovács Melinda, Cseh Sándor. T-2 és fumonizin B1 mikotoxinok hatása egérembriók fejlődésére. TOX'2015, 2015. október 14-16., Harkány

Somoskői Bence, Kovács Melinda, Cseh Sándor. Mikotoxinok hatása a korai embriók in vitro fejlődésére. 21. Szaporodásbiológiai Találkozó, 2015. szeptember 21-22., Visegrád

Somoskői Bence, Kovács Melinda, Prof. Dr. Cseh Sándor. T-2-mikotoxin okozta fejlődési anomáliák preimplantációs embriókban. Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság, 2015. május 8-9., Sümeg

Somoskői Bence, Keresztes Zsuzsanna, Kovács Melinda, Cseh Sándor. FUMONIZIN B1 ÉS T-2 MIKOTOXINOK HATÁSA SERTÉS SPERMIUMOKRA IN VITRO. MTA beszámolók 2014.január 27.

BenceSomoskői, Nicola Antonio Martino, Maria Elena Dell'Aquila, Sándor Cseh. Effects of slow freezing and vitrification on chromatin integrity, mitochondria and ROS levels in mouse embryos. In: Maráz A , Pfeiffer I , Vágvölgyi Cs (szerk.)Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2014": Program és összefoglalók. 100 p. Szeged , Magyarország , 2014.03.07 Szeged: JATEPress Kiadó, 2014. p. 36.

Bence Somoskői, Melinda Kovács, László Solti, Sándor Cseh. Effects of T-2 mycotoxin on mitochondrial pattern and apoptotic pathway in mouse embryos. 18th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction, Helsinki, Finland; 09/2014

Cseh S, Somoskoi B, Martino N, Dell'Aquilla ME, Konc J, Kanyo K, Kovacs M. The effect of T-2 mycotoxin on in vitro development of mouse embryos (preliminary studies). In: 18th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility (COGI). Vienna , Ausztria , 2013.10.24 -2013.10.27. p. 37.

Somoskői Bence, Keresztes Zsuzsanna, Kovács Melinda, Cseh Sándor. T-2 mikotoxin hatása a mitokondriumokra és az apoptotikus folyamatokra egérembriókban [Effects of T-2 mycotoxin on mitochondria and apoptotic pathway in mouse embryos] In: Bényi E, Pajor F,

Tózsér J (szerk.)IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok: Előadások és posztterek összefoglaló kötete. Gödöllő, Magyarország , 2013.10.24 -2013.10.26. pp. 63-64.

Varga A, Juhasz T, Kiss P, Tamas A, Brubel R, Vincze A, Hashimoto H, Cseh S, Somoskoi B, Reglodi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on spermatogenesis. In: Reglodi D , Tamás A (szerk.)The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. Pécs, Magyarország, 2013.08.27 -2013.08.31. p. 71.