

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
MOSONMAGYARÓVÁR
ÁLLATTENYÉSZTÉSI INTÉZET
ÁLLATGENETIKA TANSZÉK**

Programvezető és témavezető:

DR. DR. h.c. IVÁNCSICS JÁNOS
a mezőgazdasági tudomány doktora

**KÍSÉRLETEK SERTÉS PETESEJTEK IN VITRO
MATURÁLTATÁSÁRA, FERTILIZÁCIÓJÁRA ÉS SERTÉS
EMBRIÓK IN VITRO TENYÉSZTÉSÉRE**

Készítette:

BALI PAPP ÁGNES

MOSONMAGYARÓVÁR

2000

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉS

Az állattenyésztésben egyre bővül azon területek aránya, ahol a korszerű biotechnológiai módszerek alkalmazása szükségessé vált. Az első sikeres sertés embrió átültetést Magyarországon Becze és mts. hajtották végre 1986-ban. A sertés in vitro fertilizációs kísérletek Koppány vezetésével folytak a nyolcvanas évek végén. Jelenleg Rátky foglalkozik endoszkópos sertés embrió mosással/beültetéssel az ÁTK-ban. Társintézetként velük együttműködésben a Nyugat-Magyarországi Egyetemen a mi kutatócsoportunk foglalkozik sertés in vitro maturáltatással, fertilizációval és embriótenyésztéssel.

Régóta ismert, hogy a filogenetikai távolság ellenére a sertés anatómiai és fiziológiai felépítésében hasonló az emberhez. Ezt a tényt az összehasonlító géntérképezési eredmények is megerősítették, a sertés ezért jöhet szóba a xenotransz-plantációs (idegen fajból származó szervek emberbe juttatása) műtéteknél. A xenotranszplantáció gátja az idegen fajból származó szervek vagy szövetek azonnali kilökődése. Ma már létrehozhatók transzgenikus állatok, melyek szervei alkalmasak a beteg emberi szervek (szív, máj, vese) pótlására. Előállíthatók olyan transzgenikus sertések is, melyek különböző emberi betegségek modellállatai lehetnek (arteriosclerosis, sclerosis multiplex, Parkinson kór).

Hazánkban az új állatvédelmi törvény bevezetése óta az in vitro eljárások jelentősége állandóan nő. A sertés petesejtek in vitro érlelésével morfológiailag látszólag teljesen érett petesejtek állíthatók elő, de az elégtelen mag és citoplazmatikus érés következtében az in vitro fertilizáció hatékonysága kicsi, nagyfokú a polispermia, és elégtelen az embriók fejlődése. Igazolt, hogy a tüszőfolyadékban különböző ágensek halmozódnak fel, melyeket a tüsző szomatikus sejtek termelnek, és ezek befolyásolják a petesejtek érését. Az egyik legizgalmasabb

kutatási terület napjainkban a különböző növekedési faktorok hatásának vizsgálata.

Az értekezés célkitűzései:

- Célom, hogy a nukleáris transzfer és más in vitro manipulációs kísérletekhez rendelkezésre álljanak érett secunder oocyták, illetve embriók, ehhez egy in vitro maturációs, fertilizációs, embriótenyésztési rendszer létrehozása szükséges. Első lépésben tanulmányozni kell a különböző maturációs közegekben a meiózis újraindulását.
- Vizsgálandó a különböző spermiumkoncentrációk alkalmazásának hatása a fertilizációra.
- Meghatározandó a sertés petesejtek különböző in vitro maturációs közegekben való érlelésének hatása az in vitro fertilizációs paraméterek alakulására.
- Vizsgálandó a különböző kanoktól nyert mélyhűtött/visszaolvasztott spermiumokkal történő termékenyítés hatása a fertilizációs paraméterek alakulására.
- Összehasonlítandó az érett petesejtek termékenyülése különböző fertilizációs közegekben, valamint petevezető egyrétű sejtenyésztéssel történő kokultiválást alkalmazva.
- Meghatározandó a különböző növekedési faktoroknak a meiózis újraindításában játszott szerepe, különös tekintettel az EGF (Epidermal Growth Factor) és NGF (Nerve Growth Factor) szerepének tisztázására.

- Összehasonlítandó a maturáltatás alatti kokultiválás tüszőfal sejtdarabokkal vagy EGF kiegészítéssel.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2. 1. A vizsgálatok helyszíne és ideje

A vizsgálatokat 1998. január és 1999. november között a Pannon Agrártudományi Egyetem Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtudományi Karának Állattenyésztési Intézetének laboratóriumában, és 1999. április 19. és május 14. között az Amerikai Egyesült Államokban az University of Missouri Columbia Department of Animal Sciences-ben végeztem el.

2. 2. Petesejtek nyérése és maturáltatása

A sertés petefészkek, melyek nagy fehér hússertés fajtacsoportba tartozó egyedektől származtak, a helyi vágóhídról termoszban 25 °C-n szállítva kerültek a laboratóriumba 0,9% NaCl-ban, amely 75 µg/ml penicillin G és 50 µg/ml sztreptomycin szulfátot tartalmazott. A petesejteket, tüszőfal-sejtdarabokat és a tüszőfolyadékot a petefészkek 2-6 mm átmérőjű tüszőinek 10 ml-es műanyagfecskendőre csatlakoztatott 18 G jelű injekciós tűvel történő leszívásával nyertem. 30-40 compact cumulus réteggel körülvett petesejtet, melyek citoplazmájának denzitása egyenletes volt 400 µl maturációs médiumba helyeztem, melyhez 10 NE PMSG és 10 NE HCG kiegészítést alkalmaztam. Maturációs médiumként módosított TCM 199, NCSU 23, valamint Waymouth médiumot használtam. Minden vizsgált táptalajnál 10% petefészkek folyadék kiegészítés hatását is értékeltem. Tüszőfal-sejtdarabokkal történő kokultiváláskor

a petesejtek mellé hat 6-700 μm hosszúságú szomatikus sejt-preparátumot helyeztem. A maturáltatást 44 óráig CO_2 termosztátban, $38,5^\circ\text{C}$ -on történt.

2. 3. A sejtosztódás fázisainak megállapítása

A petesejteket a sejtmagérés fázisainak megállapításához a cumulus sejtektől való mentesítés érdekében 0,1% hialuronidáz enzimmel kezeltem, ezután tárgylemezen rögzítettem, majd fixáltam ecetsav: etanol 1:3 arányú friss keverékében 48-72 óráig. Ezután a tárgylemezen fixált petesejteket 1% orceinnel festettem, melyet előzetesen 45% ecetsavban oldottam, és az inverz mikroszkóp 200 illetve 400x nagyítása mellett vizsgáltam.

2. 4. Petesejtek in vitro fertilizációja

A petesejt maturáltatás végeztével, a hialuronidáz kezelést követően 30 denudált petesejtet 50 μl mTBM fertilizációs médiumba vagy 2 ml TCM 199 közegbe helyeztem, mindkét médium 1mM koffein és 0,1% BSA (mTBM) vagy 7 mM kalcium-laktát (TCM 199) kiegészítése mellett. A visszaolvasztott és 3x 1900 g, 4 percig centrifugált és PBS-ben átmosott pelletet a mosási procedúra végén in vitro fertilizációs médiumban újrasszuszpendáltam, és a spermium koncentrációt úgy állítottam be Bürker kamrás spermiumszám meghatározás után, hogy figyelembe vettem a végső fertilizációs térfogatot (mTBM közeg alkalmazásakor 100 μl mTCM közegnél 2 ml).

2. 5. Petevezető egyrétegű-sejttenyészet kialakítása

A petevezető egyrétegű-sejttenyészet kialakításához a sejteket a petevezető 45 percnyi tripszin-EDTA oldattal történő mosásával nyertem. A feleslegessé vált tripszin közömbösítése fetális borjúsavóval történt 1500 g 30 perces centrifugálás után a pelletet 10% borjúsavóval kiegészített TCM 199-ben diszpergáltam. A sejtszám beállítás (110 sejt/ml) után 2 cm átmérőjű Petri csészében tenyésztettem 38,5 °C-on, CO₂ termosztátban 2 ml ösztérfogatban. Két naponként cseréltem a tenyésztő közeget. A beoltás után 7-9 nap múlva alakult ki az egyenletes egyrétegű sejttenyészet.

2. 6. A fertilizációs paraméterek alakulásának ellenőrzése

Az in vitro fertilizáció kezdete után hat órával a petesejteket spermium mentes közegbe helyeztem. Tizenkét órával a termékenyítés után a petesejtek, illetve zigóták tárgylemezre rögzítését fixálásuk követte 48-72 óráig, 1:3 arányú friss ecetsav: etanolban. A zigóták festését a petesejtekhez hasonlóan 45% ecetsavban oldott 1% orceinnel végeztem. A zigóták vizsgálata inverz mikroszkóppal történt 200-400x nagyításon. A petesejteket akkor tekinthetők penetráló-dottaknak, ha egy vagy több fellazult spermium fej és/vagy hím pronucleus található a citoplazmában, a hozzátartozó spermium farokkal. A penetráció (PEN) megállapítása mellett meghatároztam, hogy azokba a petesejtekbe, amelyekbe spermium bejutott, milyen arányban fordult elő, hogy egynél több spermium került be és ennek meghatározásával adatokat kaptam a polispermia (POL) arányára vonatkozóan. Meghatároztam a petesejtekbe jutott átlagos spermium számot (spermium/oocyta =S/O), és a hím pronucleus kialakulásának arányát (HPN).

2. 7. In vitro embriótenyésztés

Az in vitro embriótenyésztés megvalósításához 30 zigótát helyeztem 400 µl NCSU 23 tenyésztő közegbe, amely 0,4% BSA-t tartalmazott. Az in vitro fertilizációt követő 48-144 óra között vizsgáltam az osztódó morulává, vagy blastocystává alakuló zigóták arányát inverz mikroszkóp 100 és 200x nagyításánál. Majd esetenként a blastocysták sejtszámának meghatározásához az előbbiekben ismertetett módon orceines festést alkalmaztam.

2. 8. Statisztikai értékelés

A kapott adatok átlagát és szórását az Excel program segítségével állapítottam meg. A kapott eredmények egytényezős varianciaanalízisét a Statistica program ANOVA/NANOVA részének felhasználásával végeztem el.

3. EREDMÉNYEK

3. 1. Különböző in vitro maturációs közegek összehasonlítása

Céлом egy in vitro maturációs, fertilizációs embrió tenyésztési rendszer kialakítása volt. Ennek érdekében első kísérletsorozatomban arra kerestem választ, hogy az irodalomból ismert különböző tápközegek közül melyik milyen eredményességgel alkalmazható a petesejtek megfelelő in vitro maturáltatására. A kísérleteket három in vitro érlelésre alkalmazott táptalaj összehasonlításával végeztem: NCSU 23, TCM 199 és Waymouth tápközeg. Mindegyik táptalaj esetében a 10% folliculus folyadék kiegészítést alkalmazásának hatását is

vizsgáltam. Folliculus folyadék kiegészítés nélkül a cumulus sejtek expanziója csak a Waymouth és TCM 199 tápfolyadékok használatakor volt teljes, míg az NCSU 23 médiumban érlelve a petesejteket csak a legkülső réteg lazult fel. A petesejtek maturáltatás utáni orceines festésével igazolódott, hogy a folliculus folyadék kiegészítés nagymértékben hozzájárul a megfelelő magéréshez, mindegyik vizsgált maturációs médiumban a petesejtek közel 90%-a elérte metafázis II állapotot. Tüszőfolyadék kiegészítés nélkül a petesejtek 52,0% (NCSU 23), 57,0% (Waymouth), illetve 59,8%-a (TCM 199) érte el ugyanezt a fejlettségi állapotot. Az NCSU 23 közeg alkalmazásakor, a petesejtek közel 30%-a germinális vesiculum fázisban maradt.

3. 2. Különböző spermiumkoncentrációk hatása a fertilizációra

Az érett petesejtek in vitro fertilizációjához a kísérletekben mélyhűtött magyar nagy fehér húsertés kanoktól származó termékenyítő anyagot használtam. A spermiumok életképességének bírálatát a Kovács-Foote spermafestési eljárással végeztem el. A legjobbnak bizonyult kan termékenyítő anyagát használtam fel a további kísérletekben.

A sertés in vitro fertilizáció egyik fő problémáját jelentő polispermia leküzdésére kísérleteket végeztem a megfelelő spermium koncentráció meghatározására. Vizsgáltam a $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 , 1×10^6 , koncentrációjú spermiumok petesejtek fertilizációs értékeire kifejtett hatását. A kapott eredményeket értékelve megállapítható, hogy valóban a polispermia arányának csökkenéséhez vezet a kisebb spermium koncentráció alkalmazása (49,9; 58,2; 81,8%), de az alacsony spermium koncentráció használata együtt jár a penetráció arányának csökkenésével is, tehát a vizsgált petesejtek egy jelentős részébe (46,9%) nem jut be spermium $2,5 \times 10^5$ spermium koncentráció alkalmazásakor. A

petesejtekbe jutó átlagos spermiumszám értékelésénél az alacsonyabb spermiumkoncentrációk használatakor csak egy vagy két spermium került egy-egy petesejtbe, míg 1×10^6 spermakoncentrációt alkalmazva a termékenyítésre átlagosan nyolc spermium került egy petesejtbe. Az eredmények alapján további kísérleteimben az 5×10^5 spermakoncentráció alkalmazását láttam megfelelőnek.

3. 3. Különböző maturációs közegekben történő maturáltatás hatása a fertilizációs paraméterek alakulására

A következő kísérlet sorozatban arra kerestem választ, hogy a különböző tápközegekben történő maturáltatás milyen mértékben befolyásolja az in vitro fertilizáció eredményességét. Mivel a 10% folliculus folyadék kiegészítés jó eredményeket hozott a petesejt sejtmagérés tekintetében mindhárom vizsgált maturációs közeget (TCM 199, NCSU 23, Waymouth) kiegészítettem tüszőfolyadékkal és termékenyítés után vizsgáltam a fertilizációs paraméterek alakulását.

A kapott eredmények varianciaanalízisét elvégezve azt tapasztaltam, hogy a penetráció, valamint a polispermia viszonylatában nincs $P < 0,05$ szignifikancia szinten nincs lényeges különbség a maturáltatásra használt táptalajok között, azaz a citoplazmatikus érés feltételei egyaránt adóttak mindhárom vizsgált táptalajnál. A hím pronucleus kialakulásának valószínűsége $P < 0,05$ szinten szignifikánsan kisebb Waymouth táptalajon érlelésnél (55,5%) a kísérletben kapott eredmények alapján, mint az NCSU 23 (68,2%) és TCM 199 (66,3%) táptalajoknál. A jelenség magyarázata az lehet, hogy bár a kiindulási cisztein koncentráció mindhárom táptalajnál azonos volt, valamilyen oknál fogva hím pronucleus kialakulásához fontos GSH tartalom kisebb a Waymouth táptalajban, mint az NCSU 23, vagy TCM 199 közegekben.

3. 4. In vitro fertilizáció különböző kanok spermájával

A spermafestési értékelések alapján kiválasztottam három különböző kant, melyek termékenyítő anyagával érett petesejtek in vitro fertilizációját valósítottam meg. Az adatokat értékelve megállapíthatjuk, hogy a kísérletek túlnyomó többségénél alkalmazott 1. kan termékenyítő anyagát használva a nagy penetráló képesség mellett (80,4%) aránylag nagy volt a hím pronucleus kialakulásának aránya (63,9%). A második kan spermiumainak penetráló képessége (52,0%) a három kísérlet alapján szignifikánsan kisebb volt ($P < 0,05$), mint az 1. vagy 3. kané. A második kan spermiumaival fertilizáltatva a petesejteket, a bejutó kevesebb spermiumból azonban közel azonos arányban alakultak ki hím pronucleusok (70,4%), mint az 1. kan termékenyítő anyagát használva. A harmadik kan spermiumainak penetráló képessége közel azonos volt az elsővel (76,2%), viszont szignifikánsan ($P < 0,05$) több petesejt volt polispermikus (80,2%), mint az 1. (61,4%) és 2. (60,2%) kan spermájával termékenyítve, és a petesejtenkénti spermiumszám is sokkal magasabb (7,7) volt a 3. kannál. Az adatokból látszik, hogy ebben a rendszerben vizsgálva lényeges különbség adódott a különböző spermiumok között, de annak igazolása, hogy ez milyen mértékben függ össze az in vivo termékenyítőképeséggel további vizsgálatok szükségesek.

3. 5. Különböző in vitro fertilizációs közegek alkalmazásának hatása a fertilizációs paraméterek alakulására

Két különböző in vitro fertilizációs közegben történő termékenyítés után a fertilizációs paraméterek alakulását elemezve megállapítható, hogy mindkét termékenyítő közeg (mTBM–TCM 199) egyaránt alkalmazható. Az adott kísérleti

körülmények között csak a polispermia tekintetében adódott $P < 0,05$ szinten szignifikáns különbség. A TCM 199 közegben 76,2%, míg az mTBM közegben 56,3% volt ez az érték.

3.6. In vitro fertilizáció alatti kokultiválás

Nemzetközi együttműködés keretében Spanyolországban az University of Murcia Department of Animal Biotechnology-n módomban volt egy petevezető kokultivációs módszert elsajátítani. A módszer segítségével a következő kísérletekben megvalósítottam a petevezető egyrétegű sejttenyészetben (oviduct monolayer) való termékenyítést vele párhuzamosan, kontrollként, a kokultiváció nélküli fertilizációt TCM 199 termékenyítő közegben. Az eredményeket értékelve megállapíthatjuk, hogy kokultivált oviductus sejteket tartalmazó közegben végrehajtott fertilizációt a kontrollal összehasonlítva a spermiumok penetrációs képessége nőtt (90,9%, illetve 82,3%) a polispermia szignifikánsan csökkent $P < 0,05$ szinten (52,7%, illetve 67,0%). A kokultiválás nem befolyásolta a hím pronucleusok kialakulásának arányát (73,8%, illetve 71,0%), jelentősen csökkent az egy petesejtbe jutott spermiumok aránya (1,6, illetve 2,3). A kokultiválás előnyös a fertilizáció sikeressége szempontjából, de nehéz az egyrétegű sejttenyészet létrehozása és fenntartása.

3. 7. Különböző növekedési faktorokkal történő maturáltatás hatása az embriók fejlődésére

Missouri-Columbia Egyetemen B.N. Day laboratóriumában találkoztam azzal a lehetőséggel, hogy a maturáció alatti - az addigi gyakorlatban a legtöbb laboratóriumban (így a mi kísérleteinkben is) alkalmazott - kokultiváció kiküszöbölhető. Bekapcsolódva a laboratóriumban folyó munkákba a maturációs közeg 0, 10, 20, 30 ng/ml koncentrációjú Epidermal Growth Factor (EGF) kiegészítését valósítottam meg, és ennek hatását vizsgáltam a sertés zigóták fejlődésére. A kontrollhoz (37,5%) viszonyítva, mind a morulák kialakulásának aránya (53,9%; 56,7%; 45,4%), mind a blastocysták aránya (15,5; 19,5; 12,3%) magasabb volt. Ez utóbbi esetben a kontrol értéke 3,0% volt, amely $P < 0,05$ szinten szignifikáns különbséget jelent.

Az eddig még nem vizsgált Nerve Growth Factor (NGF) növekedési faktor petesejt maturációra és ezzel összefüggésben a zigóták fejlődésére kifejtett hatásának vizsgálatát is megkezdttem. Mind a fejlődő morulák számában (kontroll: 37,3%; 1 ng/ml: 47,2%; 5 ng/ml: 41,2%; 10 ng/ml: 31,1%) , mind a blastocysták arányában (kontroll: 3,0%; 1 ng/ml: 11,2%; 5 ng/ml: 6,3%; 10 ng/ml: 4,1%) a kontrollal összehasonlítva az alkalmazott NGF koncentrációk előmozdították a petesejt érését és ennek következtében az embriófejlődés hatékonyságát. A különbségek azonban nem szignifikánsak. A koncentrációhatárok módosítása után további kísérletek elvégzése szükséges.

3. 8. A maturáltatás alatti kokultiválás folliculus szomatikus sejtekkel összehasonlítva az EGF kiegészítéssel

A következőkben megvizsgáltam, hogy az EGF kiegészítés valóban helyettesítheti-e a maturáltatás alatti kokultivációt. A maturációs közeg TCM 199 volt, folliculus sejtdarabok (FSP) vagy 10ng/ml EGF kiegészítés mellett. A petesejtek sejtmagérésében a két maturációs közeg használata nem eredményezett

jelentős különbséget (90%, 87%). A fertilizációs paraméterek vizsgálatakor megállapítottam, hogy a szomatikus sejtekkel történő kiegészítés hatására a penetrálódott petesejtek aránya 78,0% míg EGF kiegészítéssel 65,2%. A polispermia 45,3% illetve EGF kiegészítésnél 62,1% volt, ez $P < 0,05$ szinten szignifikáns eltérést jelez. A hím pronucleusok arányában a szomatikus sejtekkel történő együtt tenyésztés 73,3%, míg EGF kiegészítés mellett 60,4%, a kísérleti adatokat értékelve ebben az értékben nem volt szignifikáns eltérés.

4. ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

- A petesejtek maturáltatás alatti kokultiválása tüszőfal- sejtdarabokkal összehasonlítva az EGF kiegészítéssel azt mutatja, hogy az EGF-nek jelentős szerepe van a petesejtérés és későbbi embriófejlődés szempontjából, de a folliculus fali sejtek még egyéb növekedési faktorokat (IGF, NGF) és más, az érés szempontjából fontos anyagokat is kiválasztanak, amely teljesebbé teszik az érési folyamatot.
- A különböző növekedési faktorokkal történő maturáltatás hatása a sertés embriók fejlődésére igazolta, hogy az EGF kiegészítés elősegíti a petesejtek citoplazmatikus és magérését.
- Az NGF növekedési faktor a kísérleti eredmények alapján szintén elősegíti a petesejtek maturációját. Amennyiben beigazolódik az NGF szerepe a meiózis újraindításában ez újabb bizonyítéka lesz a neuroendokrin integrációnak.

5. JAVASLATOK

- A sertés petesejtek maturációjának további tanulmányozása, az érésben részt vevő faktorok szerepének vizsgálata.
- A polispermia elkerülésének egyik módja a spermium petesejtbe juttatása manipulációs úton. A spermiumot a petesejt zona pellucidája alá a petesejt sejthártyájának felszínére, vagy közvetlenül a citoplazmába juttathatjuk. Csoportunk megkezdte kísérleteit ezen a területen.
- A polispermia kiküszöbölésének egy másik lehetősége a fertilizációs idő jelentős csökkentése. További vizsgálatokat tervezünk a fertilizáció hatékonyságának javítására ezen az úton.
- A jól működő in vitro fertilizációs rendszer hasznosítható különböző kanok friss és mélyhűtött termékenyítő anyagának várható fertilizációs értékének in vitro becslésre.

- Az in vitro előállított secunder oocyták forrásai lehetnek a nukleáris transzfer kísérletekhez szükséges enukleált petesejteknek. Kísérleteket tervezünk a germinális őssejtek transzferének megvalósítására.
- Az NGF növekedési faktor szerepének mélyebb vizsgálata.
- A kísérleti eredmények, illetve az új tudományos eredmények lehetőséget kínálnak a törzstenyészetek állatállományának nemesítéséhez és nukleusz tenyészetek kialakításához.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

6.1. Tudományos közlemények

6.1.1. Idegen nyelven megjelent közlemények

1. **Sz. Nagy – G Házas – Á Bali Papp – F. Szász – F. Szász Jr. – A. Kovács – R.H. Foote (1999):** Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy Theriogenology 52 1153-1159.
2. **Á. Bali Papp– J Iváncsics – J. Dohy (2000):** Effect of follicular shell pieces or epidermal growth facton in a serum-free maturation medium on in vitro fertilisation parameters. Theriogenology (Abst.) 53 448.
3. **Á. Bali Papp – J. Iváncsics– J. Dohy (2000):** Production of genetically modified farm animals. Hungarian Agricultural Research 1. 9 9-11.

6.1.2. Magyar nyelven megjelent közlemények

1. **Bali Papp Á. – Iváncsics J. – Dohy J. (1999):** Sertésembriók in vitro előállításának lehetőségei. Szemleciikk. Magyar Állatorvosok Lapja. 9. 121 559-564.

2. **Somfai T. – Bali Papp Á. – Iváncsics J. (1999):** A sertés petesejtek aspirációja és in vitro maturáltatása. Acta Agronomica Óváriensis. 1. 41 101-112.

Konferencia kiadványokban megjelent közlemények

1. **Bali Papp Á. (1998):** Production of genetically modified farm animals. In: Tenk A., Szabó Z. (eds.) I.C.A. Summer School on „Agricultural Challenges and EU Enlargement”. Pannon Agricultural University Faculty of Agricultural Sciences, Mosonmagyaróvár. 247-253.
2. **Bali Papp Á. – Sótonyi L. – Iváncsics J. (1998):** Sertés petesejtek in vitro maturáltatása. XXVII. Óvári Tudományos Napok: Új kihívások a mezőgazdaság számára az EU-csatlakozás tükrében. Mosonmagyaróvár, Állattenyésztési Szekció I. 7-12.
3. **Bakainé Kelemen L. – Nagy Sz. – Bali Papp Á. – Iváncsics J. (1998):** A tárolás hatása a kansperma életképességére és az akroszóma integritására. XXVII. Óvári Tudományos Napok: Új kihívások a mezőgazdaság számára az EU-csatlakozás tükrében. Mosonmagyaróvár, Állattenyésztési Szekció. I. 208-212. (poszter)
4. **Bali Papp Á. - Sótonyi L. - Iváncsics J. (1998):** Sertés petesejtek in vitro érlelése és termékenyítése. XIV. Biotechn. Kerekasztal Konferencia. Hódmezővásárhely, okt. 15-16.
5. **Bali Papp Á. – Iváncsics J. – Dohy J. (1999):** Biotechnológiai módszerek hasznosítási lehetőségei a sertésnemesítésben. IV. Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok, április 11-14. 95-96.
6. **Bali Papp Á. – Iváncsics J. – Dohy J. (1999):** Különböző in vitro technikák az állatnemesítés szolgálatában. „Kitörési pontok a magyar állattenyésztésben” tudományos konferencia MTA, Budapest. Állattenyésztés és Takarmányozás. 6. 48 750-751.
7. **Bali Papp Á. – Iváncsics J. – Dohy J. (1999):** Különböző növekedési faktorok hatása a sertésembriók in vitro fejlődésére. 6. Szaporodásbiológiai

találkozó. A fogamzás javításának lehetőségei háziállatokban. Balatonfüred, okt. 25-26. (megjelenés alatt)

- 8 **Sz. Nagy – A. Bali Papp – P. Sarlós – Gy. Gábor – J. Iváncsics - A. Kovács (1999):** The tale of the tail – IV. International Conference on Boar Semen Preservation. 8-11 August, Beltsville, MD, USA, 14. – (poster)
- 9 **Á. Bali Papp, Sz. Nagy, J. Iváncsics, A. Kovács, T. Pécsi and J. Dohy (1999):** Comparison of viability and acrosome status of boar spermatozoa frozen in mini or maxi straws - 50th Annual Meeting of EAAP. 22-26 August, Zurich, Switzerland, 126. – (poster)