

Artykuł przeglądowy

Iniekcja plemnika do cytoplazmy (ICSI) jako alternatywa dla standardowego zapłodnienia *in vitro* u świń*

Iwona Rajska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Iniekcja plemnika do cytoplazmy oocyty (ICSI) jest jedną z metod wspomaganego rozrodu, która znalazła zastosowanie w pozaustrojowej produkcji zarodków u zwierząt oraz leczeniu niepłodności u ludzi. Metoda ICSI umożliwia eliminację zjawiska polispermii, wykorzystanie plemników jako wektorów egzogenego DNA w celu uzyskania zwierząt transgenicznych, wspomaga tworzenie programów zachowania bioróżnorodności oraz poznanie mechanizmów zachodzących w trakcie zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego. Zapłodnieniu metodą ICSI poddaje się oocyty dojrzałe *in vitro*, *in vivo* i kriokonserwowane oraz nasienie ejakulowane bądź najądrzowe, świeże lub konserwowane. Iniekcję plemnika przeprowadza się w mikroskopie odwróconym z dołączonym mikromanipulatorem wyposażonym w pipetę podtrzymującą oraz iniekcyjną. Po wykonaniu iniekcji oocyty poddaje się sztucznej aktywacji i przeznaczają do hodowli *in vitro*. Uzyskane zarodki poddaje się ocenie jakości. Pomimo potencjalnych możliwości związanych z ICSI wciąż istnieją problemy, które ograniczają wdrożenie tej metody zapłodnienia do pozaustrojowej produkcji zarodków na skalę komercyjną. Czynniki mogące wpływać na efektywność ICSI są: jakość oocytów i plemników oraz ich przygotowanie do zapłodnienia, uszkodzenia oocyty powstałe w trakcie iniekcji, toksyczność związków wykorzystywanych do spowolnienia ruchu plemników i aktywacja oocytów po iniekcji. W wyniku zapłodnienia metodą ICSI liczba uzyskanych zarodków jest niska, a ich jakość często jest obniżona. Niezbędne są zatem dalsze badania optymalizujące nie tylko samą technikę zapłodnienia, ale również poszczególne jej etapy, tj. dojrzewanie *in vitro* oocytów oraz przygotowanie plemników.

SŁOWA KLUCZOWE: ICSI / świnia / oocyt / plemnik

Zapłodnienie *in vitro* jest jednym z etapów kompleksowej pozaustrojowej produkcji zarodków, który obejmuje pozyskanie i przygotowanie nasienia (kapacytację), przygotowanie oocytów oraz wspólną inkubację gamet.

*Praca sfinansowana z zadania statutowego IZ PIB nr 02-007.1 (2015).

U świń w przypadku zapłodnienia *in vitro* metodą standardową ponad 50% oocytów może być zapłodnionych polispermicznie, co znacznie obniża efektywność zapłodnienia [31, 67]. Dlatego poszukuje się metod, które ograniczą lub wyeliminują zjawisko polispermii u tego gatunku.

Rozwiązaniem problemu zapłodnienia polispermicznego u świń może być zastosowanie jednej z technik zapłodnienia, która polega na wprowadzeniu do cytoplazmy (ICSI – z ang. Intra Cytoplasmic Sperm Injection) lub pod osłonkę przejrzystą dojrzałego oocyty (SUZI – z ang. Subzonal Sperm Injection) tylko jednego plemnika.

Po raz pierwszy próbę zapłodnienia przez wprowadzenie plemnika do oocyty jeźowca przeprowadził Hiramoto w 1962 roku [cyt. za 36, 68]. Kolejnym eksperymentem było zapłodnienie oocyty płaza, które wykonał Brun w 1974 roku [cyt. za 36]. U ssaków technikę tę pierwsi zastosowali Uehara i Yanagimachi w 1976 roku [64]. W kolejnych latach uzyskano pierwsze potomstwo u bydła [20], później u myszy [1, 33], owiec [6], koni [9], małąp [21], kotów [19], królików [45], szczurów [22], chomików [69] oraz kóz [66]. Od lat 90. ubiegłego stulecia technika ICSI jest wykorzystywana w zapłodnieniu *in vitro* u ludzi [58].

U świń po raz pierwszy zapłodnienie techniką ICSI przeprowadzili Catt i Rhodes w 1995 roku [5], ale dopiero późniejsze doświadczenia przeprowadzone przez Kolbe i Holtz [36, 37] oraz Martina [49] pozwoliły uzyskać na tej drodze żywe potomstwo.

Główną zaletą zapłodnienia metodą ICSI jest możliwość wykorzystania do zapłodnienia nasienia o obniżonej koncentracji lub ruchliwości plemników, nasienia seksowanego, kriokonserwowanego czy też pobranego *post mortem* [36, 46, 47, 51, 60, 65]. U świń metodą ICSI wykorzystywano głównie w celu eliminacji polispermii, która – jak wcześniej wspomniano – obniża efektywność prawidłowego zapłodnienia *in vitro* [14, 16, 28, 34, 46, 57, 62, 65].

Zapłodnienie metodą ICSI stwarza też możliwości wykorzystania plemników jako wektorów egzogennej DNA dla uzyskania zwierząt transgenicznych (Sperm-Mediated Gene Transfer – ICSI-SMGT) [4, 10, 11, 39, 40, 41, 59, 74]. Może być także pomocne w programach zachowania bioróżnorodności, jak też ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem [43, 44, 47, 57]. Trzeba też podkreślić, że doświadczenia z wykorzystaniem metody ICSI przyczyniły się do poznania fundamentalnych mechanizmów zachodzących w trakcie zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego [8, 44, 46, 57, 71].

Do zapłodnienia metodą ICSI u świń wykorzystuje się nasienie ejakulowane [3, 14, 15, 24, 28, 43, 61] lub najądrzowe [36, 55, 60, 72]. Nasienie wykorzystuje się bezpośrednio po pobraniu i wstępnym rozrzedzeniu (nasienie świeże) [37], jak też po konserwacji w stanie płynnym [32, 49] lub zamrożonym [15, 16, 25, 34, 44], ewentualnie po liofilizacji [26, 38, 51, 56]. Metoda ICSI umożliwia również wykorzystanie plemników pozyskanych z gonad niedojrzałych płciowo knurków przeszczepionych zwierzętom innego gatunku, np. myszom [54].

Plemniki knura przeznaczone do zapłodnienia techniką ICSI wymagają odpowiedniego przygotowania. Plemniki świeże i konserwowane w stanie płynnym przemywa się 2-3-krotnie w celu usunięcia pozostałości rozrzedzalnika [15, 16, 32]. Plemniki kriokonserwowane rozmraża się w łaźni wodnej, a liofilizowane rozpuszcza się w dejonizowanej wodzie destylowanej. Następnie plemniki poddawane są wirowaniu w gradiencie Percollu (45%/90%) [16] lub inkubacji w 39°C przez 30 minut (technika swim-up), w celu poży-

skania frakcji żywej [25, 34] i zawieszają się w roztworze PBS-BSA (bovine serum albumin) [51] lub w medium z dodatkiem PVP (polywinylopyrrolidone) w celu spowolnienia ich ruchu [38]. Tak przygotowane plemniki inkubuje się w temperaturze 38°C nie dłużej niż 1-2 godziny do momentu wykonania iniekcji. Równoległe wykonuje się ocenę żywotności plemników. W tym celu próbkę nasienia inkubuje się z barwnikami fluorescencyjnymi, np. SYBR-14 i PI (propidium iodide) dla stwierdzenia plemników żywych i martwych [44] lub z barwnikami FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate-peanut agglutinin) i PI pozwalającymi na ocenę plemników z nienaruszonym lub uszkodzonym akrosomem [16].

Oocyty świni przeznaczone do zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI pozyskuje się od loch lub loszek poubojowo [25, 32, 34, 46, 62]. Niedojrzałe oocyty poddaje się dojrzewaniu *in vitro* w medium o zdefiniowanym składzie, w temperaturze 39°C, 5% stężeniu CO₂ w atmosferze i maksymalnej wilgotności. Hodowlę oocytów prowadzi się dwuetapowo, przez 42 do 50 godzin [8, 16, 38, 42, 44, 52, 61, 72]. Dojrzałe oocyty oczyszcza się z komórek wzgórnka jajonośnego za pomocą enzymu hialuronidazy, a następnie ocenia wygląd cytoplazmy oraz obecność I ciała kierunkowego [46, 49, 61, 62]. Dodatkowym kryterium oceny efektywności dojrzewania jest ocena stadium oocytu. W tym celu oocyty utrwalają się, a następnie barwi orceiną [24, 34, 35] lub barwnikiem Hoechst 33342 [15].

Zapłodnieniu metodą ICSI można poddawać również oocyty dojrzałe *in vivo* [36, 49, 60] lub kriokonserwowane [12, 48, 61]. Jak dotychczas próby zapłodnienia *in vitro* zarówno metodą standardową, jak i ICSI kriokonserwowanych oocytów świni nie doprowadziły do uzyskania potomstwa. Dokonano tego natomiast stosując witrifikowane oocyty przeniesione do inseminowanych bioczerni i zapłodnienie w warunkach *in vivo* [13].

Ostatnim etapem zapłodnienia metodą ICSI jest wykonanie iniekcji plemnika. Dokonuje się tego w mikroskopie odwróconym z dołączonymi mikromanipulatorami. W tym celu na podgrzany do temperatury 38,5°C stolik mikroskopu umieszcza się szalkę Petriego z pojedynczą kroplą mieszaniny rozrzedzonego nasienia i roztworu PBS-PVP oraz jedną kroplę medium, np. NCSU-23, TLH-PVA lub PBS z dodatkiem 10% FCS, do której wprowadza się 10-18 oczyszczonych oocytów przeznaczonych do mikroiniekcji [7, 24, 25, 34]. Innym wariantem jest „postawienie” pojedynczych kropli, do których oocyty wprowadza się pojedynczo albo parami (10-16) [14, 16, 48, 49, 60]. Krople przykrywa się ogrzanym olejem mineralnym. Następnie przeprowadza się iniekcję plemnika do oocytu za pomocą szklanej pipety iniekcyjnej przygotowanej w warunkach laboratoryjnych [38, 71] lub dostępnej komercyjnie [49, 60]. Za pomocą drugiej pipety podtrzymującej unieruchamia się oocyt tak, aby I ciało kierunkowe znajdowało się w pozycji godziny 12. lub 6. Takie ułożenie oocytu pozwala na przeprowadzenie iniekcji bez uszkodzenia jego wrzeczona kariokinetycznego [28, 36, 48]. Po wyszukaniu plemnika o prawidłowej budowie morfologicznej, końcem pipety iniekcyjnej unieruchamia się go poprzez złamanie wstawki lub witki i wraz z niewielką ilością medium aspiruje od strony witki lub główki do wnętrza pipety [15, 16, 36, 44, 46, 49]. Następnie igłą iniekcyjną w sposób manualny lub poprzez pulsacyjne nakłuwanie (piezo) przebija się otoczkę przejrzystą oocytu w pozycji godziny 3., aspiruje do wnętrza niewielką ilość cytoplazmy oocytu i uwalnia do wnętrza oocytu zawartość pipety iniekcyjnej (plemnik wraz z pobraną cytoplazmą oraz niewielką objętością medium) [3, 28, 32, 36, 53, 55, 60, 62]. Natychmiast po iniekcji, delikatnie usuwa się pipetę iniekcyjną i uwalnia oocyt z pipety podtrzymującej. Ma to na celu zminimalizowa-

nie ciśnienia wewnątrzkomórkowego wywieranego na oocyt [32, 72]. Do oocytu można wprowadzić plemnik ruchliwy [24, 32, 34, 35, 46, 62], martwy lub z uszkodzonym aparatem ruchowym [16] lub też wyizolowaną główkę plemnika [32, 38, 44, 55], spermatydę [42] czy też ekstrakt z plemników [50].

Po wykonaniu iniekcji oocyty wraz z wprowadzonym plemnikiem poddawane są aktywacji w komorze elektrycznej [7, 43, 55] lub inkubowane w medium z jonami wapnia [8, 60] albo przenoszone bezpośrednio do medium do hodowli [15, 34, 49, 70]. Aktywacji można dokonać również przed iniekcją lub w jej trakcie, wprowadzając do oocytu wraz z plemnikiem niewielką ilość roztworu jonów wapnia [60].

Hodowlę *in vitro* potencjalnych zygot świni uzyskanych w wyniku zapłodnienia metodą ICSI prowadzi się najczęściej w medium NCSU-23 [8, 25, 60, 63, 71, 73]. Zarodki hoduje się do stadium blastocysty, w kroplach medium pod olejem mineralnym lub w naczynkach 4-oczkowych typu Nunc, w temperaturze 39°C, 5% stężeniu CO₂ w powietrzu i maksymalnej wilgotności. W trakcie prowadzonej hodowli *in vitro* co 24 godziny ocenia się tempo rozwoju i stan morfologiczny zarodków. Uzyskane blastocysty poddaje się ocenie. Najczęściej ocenia się stopień fragmentacji DNA komórek zarodka, np. metodą TUNEL [46, 48], liczbę wszystkich jąder komórkowych zarodka, np. barwieniem DAPI, Hoechst 33342 lub Giemśą [12, 14, 15, 34, 35, 46, 48], a także analizę chromosomów [7, 32, 42, 68, 72].

Ostateczną weryfikacją jakości zarodków świni uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro* jest ich zdolność do pełnego rozwoju *in vivo*, tj. po przeniesieniu do synchronizowanych bioczyń. Wówczas ocena obejmuje odsetek loch prośnych oraz liczbę urodzonych prosiąt żywych i martwych w stosunku do przeniesionych zarodków [17, 28, 37, 39, 49, 55, 60, 70, 72].

Potencjalne możliwości ICSI u świń są, jak dotychczas, wykorzystywane w niewielkim stopniu. Wciąż istnieją problemy, które ograniczają wdrożenie tej techniki zapłodnienia do pozaustrojowej produkcji zarodków na skalę komercyjną [16]. Czynniki mogące wpływać na efektywność tej metody zapłodnienia są: jakość oocytów przeznaczonych do dojrzewania i zapłodnienia [73], jakość plemników i ich przygotowanie [3, 14, 16, 28, 38, 44, 51, 71, 72], uszkodzenia oocytu powstałe w trakcie zabiegu iniekcji [30], toksyczność związków wykorzystywanych do spowolnienia ruchu plemników [34] oraz aktywacja oocytów po iniekcji [8, 14, 15, 30, 43, 44, 50, 52, 72].

Podstawowym źródłem oocytów przeznaczanych do hodowli *in vitro* i następnie do zapłodnienia *in vitro* metodą standardową, jak i ICSI, są jajniki pozyskiwane od zwierząt rzeźnych. Są to przede wszystkim osobniki niedojrzałe płciowo, u których na jajnikach nie obserwuje się owulacji i ciałek żółtych. Przypuszcza się, że oocyty pochodzące od takich zwierząt posiadają niższe kompetencje rozwojowe, co obniża efektywność ich dojrzewania, zapłodnienia i rozwoju zarodkowego w warunkach pozaustrojowych [73].

Jedną z przyczyn niskiej efektywności metody ICSI są zaburzenia w dekondensacji chromatyny jądrowej plemnika oraz nieprawidłowości w tworzeniu się męskiego przedjądrza [14, 34, 43, 57, 60]. Plemniki wykorzystywane do iniekcji oocytów wymagają odpowiedniego przygotowania. W warunkach pozaustrojowych przeprowadza się ich kapacytację, by w ten sposób uzyskały zdolność do zapłodnienia oocytu. Plemnik wprowadzany do oocytu podczas iniekcji metodą ICSI nie przechodzi reakcji akrosomowej, zachowując

pewne elementy, takie jak enzymy hydrolityczne oraz w niewielkim stopniu naruszoną błonę komórkową i otoczkę okołojądrową, które w warunkach fizjologicznych, a także podczas zapłodnienia metodą standardową są usuwane podczas penetracji osłonki przejrzystej oocytu. Obecność tych elementów może być jedną z przyczyn braku dekondensacji jądrowego DNA plemnika i niskiego odsetka tworzenia się męskiego przedjądrza [14, 28]. Dlatego przed wprowadzeniem plemnika do oocytu przeprowadza się zabiegi, które prowadzą do częściowego uszkodzenia błony cytoplazmatycznej. Może to być na przykład mrożenie bez dodatku substancji osłaniających [27], dodatek progesteronu – czynnika mogącego wyzwać reakcję akrosomową [27] lub związków chemicznych rozpuszczających błonę komórkową, np. Triton X-100 [14, 44], rozrywających wiązania dwusiarczkowe, np. ditiotreitol (DTT) [7, 70], glutation (GSH) [7] lub mechaniczne uszkodzenie błony komórkowej plemnika [71]. Do częściowego naruszenia błony cytoplazmatycznej plemnika można doprowadzić, poddając plemniki działaniu temperatury lub ultradźwięków. Dlatego też do iniekcji wykorzystywano m.in. plemniki pochodzące z nasienia liofilizowanego [26, 38, 51], poddanego sonikacji [38] lub przechowywanego przez dłuższy czas w temperaturze 4-24°C [3].

Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że sposób przygotowania plemników do ICSI ma wpływ na wyniki zapłodnienia i rozwój zarodkowy [16]. Plemniki mrożone lub liofilizowane mogą wykazywać uszkodzenia chromatyny jądrowej i centrioli, co skutkuje nieprawidłową jej dekondensacją oraz brakiem możliwości przekształcenia się w męskie przedjądrze [16, 51]. W tym przypadku poszukuje się czynników chemicznych, które mogłyby stabilizować i chronić DNA plemnika przed uszkodzeniami powstałymi w trakcie mrożenia lub liofilizacji [26, 51]. Natomiast stosowanie związków chemicznych, takich jak Triton X-100 lub DTT oraz uszkodzenia oocytu powstałe w trakcie zabiegu iniekcji, który nie jest zjawiskiem fizjologicznym, mogą wpływać szkodliwie na dalszy rozwój oocytów po ICSI i obniżyć efektywność zapłodnienia [30]. Nie można pominąć również wpływu niektórych używanych związków chemicznych, np. PVP, które po wprowadzeniu do cytoplazmy oocytu mogą oddziaływać szkodliwie [34].

W przypadku świni początkowo nie stosowano aktywacji oocytów [37, 49, 68, 70], ale późniejsze badania [8, 39] wykazały jej korzystny wpływ przejawiający się poprawą efektywności zapłodnienia metodą ICSI. Ponadto wykazano, że zastosowanie aktywacji w polu elektrycznym w połączeniu z wysoką koncentracją jonów wapnia zwiększa odsetek oocytów świni dzielących się partenogenetycznie [60]. Natomiast u myszy [33, 59], chomików [23] i królików [29] po zapłodnieniu metodą ICSI dodatkowa aktywacja oocytu nie jest wymagana [43, 52].

Z drugiej strony, skutki nieprawidłowej dekondensacji chromatyny jądrowej plemnika i opóźnienia w formowaniu się męskiego przedjądrza, o którym wspomniano już wcześniej, są powodem obniżenia potencjału rozwojowego zarodków [34, 46]. Przejawia się to spowolnieniem ich tempa rozwoju, spadkiem liczby uzyskanych blastocyst [57] oraz ich obniżoną jakością [14, 46, 51, 57, 63].

Warto podkreślić, że niektórzy autorzy, jak Yong i wsp. [71] oraz Li i wsp. [46], w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego metodą ICSI uzyskali niższy odsetek blastocyst (odpowiednio od 2 do 20%) w porównaniu z odsetkiem uzyskanych zarodków w tym stadium po zapłodnieniu metodą standardową (odpowiednio od 27 do 35%). Natomiast w badaniach

Mandryk [48] oraz Wu i wsp. [68] wyższą liczbę blastocyst uzyskano po zapłodnieniu metodą ICSI w porównaniu z metodą standardową (odpowiednio 36 i 30 oraz 12 i 8 blastocyst). W zarodkach świni uzyskanych w wyniku zapłodnienia metodą ICSI obserwowano wolniejsze tempo rozwoju w porównaniu z zarodkami uzyskanymi po zapłodnieniu metodą standardową [46, 57]. Natomiast w blastocystach uzyskanych po zapłodnieniu zarówno jedną, jak i drugą metodą nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie komórek apoptotycznych [46, 48]. Z drugiej strony, obserwowano niższą liczbę komórek w blastocystach uzyskanych w wyniku zapłodnienia metodą ICSI w porównaniu z uzyskanymi po zapłodnieniu metodą standardową [46, 48, 57]. Przeciwnie, badania Wu i wsp. [68], Yong i wsp. [71] oraz Yoo i wsp. [72] nie wykazały istotnych różnic w liczbie komórek w blastocystach uzyskanych po zapłodnieniu zarówno metodą standardową, jak i ICSI.

Uważa się, że zapłodnienie pozaustrojowe niezależnie od stosowanej techniki może istotnie wpływać na transkryptom zarodka w okresie przedimplantacyjnym, szczególnie na geny odpowiedzialne za podstawowe funkcje komórki i jej metabolizm [2, 18]. Przykładem mogą być zarodki bydłce uzyskane w wyniku zapłodnienia metodą ICSI, w których obserwowano wysoki poziom ekspresji genu białka Bax (białko o działaniu proapoptotycznym), ale nie było to skorelowane z liczbą komórek apoptotycznych w zarodku. Natomiast zarodki świni uzyskane w wyniku zapłodnienia metodą ICSI charakteryzowały się niższym poziomem ekspresji genów proapoptotycznych, a poziom ekspresji genów przeciwdziałających apoptozie był wyższy w porównaniu z zarodkami po zapłodnieniu metodą standardową [46].

Podsumowując, iniekcja plemnika do cytoplazmy oocyty jest jedną z metod wspomaganego rozrodu, która może stanowić alternatywę dla standardowego zapłodnienia *in vitro* u świń. Znajduje głównie zastosowanie w pozaustrojowej produkcji zarodków, np. do celów hodowlanych, dzięki możliwości wykorzystania nasienia seksowanego. Dodatkowymi korzyściami związanymi z tą metodą zapłodnienia pozaustrojowego jest wykorzystanie plemników jako wektorów przy tworzeniu zwierząt transgenicznych oraz programów ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem. Trzeba też zaznaczyć, że w wyniku zapłodnienia metodą ICSI liczba uzyskanych zarodków jest niska, a ich jakość jest często obniżona. Konieczne są więc dalsze badania nie tylko optymalizujące samą technikę zapłodnienia, ale również poszczególne jej etapy, takie jak: dojrzewanie *in vitro* oocytów, przygotowanie nasienia oraz hodowla *in vitro* uzyskanych zarodków.

PIŚMIENNICTWO

1. AHMADI A., NG S.C., LIOW S.L., ALI J., BONGSO A., RATNAM S.S., 1995 – Intracytoplasmic sperm injection of mouse oocytes with 5mM Ca²⁺ at different intervals. *Human Reproduction* 10, 431-435.
2. ARIAS M.E., RISOPATRON J., SANCHEZ R., FELMER R., 2015 – Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. *Reproductive Biology* 15, 34-41.
3. BINH N.T., VAN THUAN N., MIYAKE M., 2009 – Effects of liquid preservation of sperm on their ability to activate oocytes and initiate preimplantational development after intracytoplasmic sperm injection in the pig. *Theriogenology* 71, 1440-1450.

4. CANOVAS S., GUTIERREZ-ADAN A., GADEA J., 2010 – Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the Sperm Mediated Gene Transfer (SMGT) technique. *Molecular Reproduction and Development* 77, 687-698.
5. CATT J.W., RHODES S.L., 1995 – Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reproduction, Fertility and Development* 7, 161-167.
6. CATT S.L., CATT J.W., GOMEZ M.C., MAXWELL W.M., EVANS G., 1996 – Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection of a single presumptive male sperm. *Veterinary Record* 139, 494-495.
7. CHENG W.M., AN L., WU Z.H., ZHU Y.B., LIU J.H., GAO H.M., LI X.H., ZHENG S.J., CHEN D.B., TIAN J.H., 2009 – Effects of disulfide bond reducing agents on sperm chromatin structural integrity and developmental competence of in vitro matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reproduction* 137, 633-643.
8. CHENG W.M., WU Z.H., ZHANG X., ZHU Y.B., PANG Y.W., GUO M., WANG D., TIAN J.H., 2012 – Effects of different activation regimens on pronuclear formation and developmental competence of in vitro-matured porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 609-614.
9. COCHRAN R., MEINTJES M., REGGIO B., HYLAN D., CARTER J., PINTO C., PACCAMONTI D., GODKE R.A., 1998 – Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 18, 736-740.
10. DE CECCO M., SPINACI M., ZANNONI A., BERNARDINI C., SEREN E., FORNI M., BACCI M.L., 2010 – Coupling sperm mediated gene transfer and sperm sorting techniques: a new perspective for swine transgenesis. *Theriogenology* 74, 856-862.
11. EGHBALSAIED S., GHAEDI K., LAIBLE G., HOSSEINI S.M., FOROUZANFAR M., HAJIAN M., OBACK F., NASR-ESFAHANI M.H., OBACK B., 2013 – Exposure to DNA is insufficient for in vitro transgenesis of live bovine sperm and embryos. *Reproduction* 145, 97-108.
12. FUJIHIRA T., KISHIDA R., FUKUI Y., 2004 – Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology* 49, 286-290.
13. GAJDA B., ZIELIŃSKA-SKRZYPCZAK M., GAWROŃSKA B., SŁOMSKI R., SMORAĞ Z., 2015 – Successful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using OPS method. *Cryoletters* 36, 8-18.
14. GARCIA-MENGUAL E., GARCIA-ROSELLO E., ALFONSO J., SALVADOR I., CEBRIAN-SERRANO A., SILVESTRE M.A., 2011 – Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with Triton X-100 in pigs. *Theriogenology* 76, 1658-1666.
15. GARCIA-ROSELLO E., COY P., VASQUEZ F.A.G., RUIZ S., MATAS C., 2006 – Analysis of different factors influencing the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) yield in pigs. *Theriogenology* 66, 1857-1865.
16. GARCIA-ROSELLO E., MATAS C., CANOVAS S., MOREIRA P., GADEA J., COY P., 2006 – Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Journal of Andrology* 27, 268-275.
17. GARCIA-VASQUEZ F.A., RUIZ S., MATAS C., IZQUIERDO-RICO M.J., GRULLON L.A., DE ONDIZ A., VIEIRA L., AVILES-LOPES K., GUTIERREZ-ADAN A., GADEA J., 2010 – Production of transgenic piglets using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reproduction* 140, 259-272.

18. GIRITHARAN G., LI M.W., DE SEBASTIANO F., ESTEBAN F.J., HORCAJADAS J.A., LLOYD K.C.K., DONJACOUR A., MALTEPE E., RINAUDO P.F., 2010 – Effect of ICSI on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Human Reproduction* 25, 3012-3024.
19. GOMEZ M.C., POPE C.E., HARRIS R., DAVIS A., MIKOTA S., DRESSER B.L., 2000 – Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 12, 423-433.
20. GOTO K., YANAGITA K., 1995 – Normality of calves obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 10, 1554.
21. HEWITSON L., DOMINKO T., TAKAHASHI D., MARTINOVICH C., RAMALHO-SANTOS J., SUTOVSKY P., FANTON J., JACOB D., MONTEITH D., NEURINGER M., BATTAGLIA D., SIMERLY C., SCHATTEEN G., 1999 – Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nature Medicine* 5, 431-433.
22. HIRABAYASHI M., KATO M., AOTO T., SEKIMOTO A., UEDA M., MIYOSHI I., KASAI N., HOCHI S., 2002 – Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Research* 11, 221-228.
23. HOSHI K., YANAGIDA K., SATO A., 1992 – Pretreatment of hamster oocytes with Ca²⁺ ionophore or facilitate fertilization by ooplasmic micro-injection. *Human Reproduction* 7, 871-875.
24. ISHIZAKI C., WATANABE H., BHUIYAN M.M.U., FUKUI Y., 2009 – Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. *Theriogenology* 72, 72-80.
25. KAMIYA C., KOBAYASHI M., FUKUI Y., 2006 – In vitro culture conditions using chemically defined media for in vitro matured and intracytoplasmically inseminated porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Developmental* 52, 625-632.
26. KANG H.H., LEE J.W., KANG M.J., KIM K.H., MOON S.J., 2014 – In vitro development of porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection of freeze-dried spermatozoa with trehalose. *Journal of Embryo Transfer* 29, 51-57.
27. KATAYAMA M., MIYANO T., MIYAKE M., KATO S., 2002 – Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote* 10, 95-104.
28. KATAYAMA M., RIEKE A., CANTLEY T., MURPHY C., DOWELL L., SUTOVSKY P., DAY B.N., 2007 – Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture in a cysteine-supplemented medium. *Theriogenology* 67, 835-847.
29. KEEFER C.L., 1989 – Fertilization by sperm injection in the rabbit. *Gamete Research* 22, 59-69.
30. KIKUCHI K., 2004 – Developmental competence of porcine blastocysts produced in vitro. *Journal of Reproduction and Developmental* 50, 21-28.
31. KIKUCHI K., SOMFAI T., NAKAI M., NAGAI T., 2009 – Appearance, fate and utilization of abnormal porcine embryos produced by in vitro maturation and fertilization. *Society for Reproduction and Fertility Supplements* 66, 135-147.
32. KIM N.H., LEE J.W., JUN S.H., LEE H.T., CHUNG K.S., 1998 – Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Molecular Reproduction and Development* 51, 436-444.

33. KIMURA Y., YANAGIMACHI R., 1995 – Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of Reproduction* 52, 709-720.
34. KISHIDA R., LEE E.S., FUKUI Y., 2004 – In vitro maturation of porcine oocytes using a defined medium and development capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 62, 1663-1676.
35. KOBAYASHI M., LEE E.S., FUKUI Y., 2006 – Cysteamine or β -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 65, 1191-1199.
36. KOLBE T., HOLTZ W., 1999 – Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology* 52, 671-682.
37. KOLBE T., HOLTZ W., 2000 – Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Animal Reproduction Science* 64, 97-101.
38. KWON I.K., PARK K.E., NIWA K., 2004 – Activation, pronuclear formation, and Development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction* 71, 1430-1436.
39. LAI L., SUN Q., WU G., MURPHY C.N., KÜHHOLZER B., PARK K.W., BONK A.J., DAY B.N., PRATHER R.S., 2001 – Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into in vitro matured oocytes. *Zygote* 9, 339-346.
40. LAVITRANO M., BUSNELLI M., CERRITO M.G., GIOVANNONI R., MANZINI S., VARGIOLU A., 2006 – Sperm-mediated gene transfer. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 19-23.
41. LAVITRANO M., FORNI M., VARZI V., PUCCI L., BACCI M.L., DI STEFANO C., FIORETTI D., ZORAQI G., MOIOLI B., ROSII M., LAZZERESCHI D., STOPPACCIARO A., SEREN E., ALFANI D., CORTESINI R., FRATTI L., 1997 – Sperm-Mediated Gene Transfer: Production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplantation Proceedings* 29, 3508-3509.
42. LEE J.W., KIM N.H., LEE H.T., CHUNG K.S., 1998 – Microtubule and chromatin organization during the first cell-cycle following intracytoplasmic injection of round spermatid into porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 50, 221-228.
43. LEE J.W., TIAN X.C., YANG X., 2003 – Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction* 68, 1341-1347.
44. LEE J.W., YANG X., 2004 – Factors affecting fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of sperm. *Molecular Reproduction and Development* 68, 96-102.
45. LI G.P., CHEN D.Y., LIAN L., SUN Q.Y., WANG M.K., LIU J.L., LI J.S., HAN Z.M., 2001 – Viable rabbits derived from reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Molecular Reproduction and Development* 58, 180-185.
46. LI X.X., LEE D.S., KIM K.J., LEE J.H., KIM E.Y., PARK J.Y., 2013 – Leptin and nonessential amino acids enhance porcine preimplantation embryo development in vitro by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 79, 291-298.
47. LOPEZ-SAUCEDO J., PARAMIO-NIETO M.T., FIERRO R., PINA-AGUILAR R.E., 2012 – Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 133, 129-138.

48. MANDRYK I., 2013 – Optymalizacja warunków hodowli zarodków uzyskanych po zapłodnieniu metodą ICSI świeżych i kriokonserwowanych oocytów świni. Praca doktorska, wyd. IZ PIB.
49. MARTIN M.J., 2000 – Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction* 63, 109-112.
50. MATSUURA D., MAEDA T., 2009 – Embryo development of porcine oocytes after injection with miniature pig sperm and their extracts. *Animal Science Journal* 80, 644-648.
51. MEN N.T., KIKUCHI K., NAKAI M., FUKUDA A., TANIHARA F., NOGUCHI J., KANEKO H., LINH N.V., NGUYEN B.X., NAGAI T., TAJIMA A., 2013 – Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 80, 1033-1044.
52. NAKAI M., ITO J., SATO K., NOGUCHI J., KANEKO H., KASHIWAZAKI N., KIKUCHI K., 2011 – Pre-treatment of sperm reduces success of ICSI in the pig. *Reproduction* 142, 285-293.
53. NAKAI M., KANEKO H., SOMFAI T., MADEOMARI N., OZAWA M., NOGUCHI J., KASHIWAZAKI N., KIKUCHI K., 2009 – Generation of porcine diploid blastocysts after injection of spermatozoa grown in nude mice. *Theriogenology* 72, 2-9
54. NAKAI M., KANEKO H., SOMFAI T., MAEDOMARI N., OZAWA M., NOGUCHI J., ITO J., KASHIWAZAKI N., KIKUCHI K., 2010 – Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction* 139, 331-335.
55. NAKAI M., KASHIWAZAKI N., TAKIZAWA A., HAYASHI Y., NAKATSUKASA E., FUCHIMOTO D., NOGUCHI J., KANEKO H., SHINO M., KIKUCHI K., 2003 – Viable piglets generated from porcine oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biology of Reproduction* 68, 1003-1008.
56. NAKAI M., KASHIWAZAKI N., TAKIZAWA A., MAEDOMARI N., OZAWA M., NOGUCHI J., KANEKO H., SHINO M., KIKUCHI K., 2007 – Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. *Zygote* 1, 15-24.
57. NAKAI M., OZAWA M., MAEDOMARI N., NOGUCHI J., KANEKO H., ITO J., ONISHI A., KASHIWAZAKI N., KIKUCHI K., 2014 – Delay in cleavage of porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) shows poorer embryonic development. *Journal of Reproduction and Developmental* 60, 256-259.
58. PALERMO G., JORIS H., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A.C., 1992 – Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17-18.
59. PERRY A.C., WAKAYAMA T., KISHIKAWA H., KASAI T., OKABE M., TOYODA Y., YANAGIMACHI R., 1999 – Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284, 1180-1183.
60. PROBST S., RATH D., 2003 – Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology* 59, 961-973.
61. SHI L.Y., JIN H.F., KIM J.G., KUMAR B.M., BALASUBRAMANIAN S., CHOE S.Y., RHO G.J., 2007 – Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Animal Reproduction Science* 100, 128-140.

62. SUZUKI Y., WATANABE H., FUKUI Y., 2010 – Effects of seasonal changes on in vitro development of competence of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 56, 396-399.
63. TAKA M., IWAYAMA H., FUKUI Y., 2005 – Effect of the well of the well (WOW) system on in vitro culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Reproduction and Development* 51, 533-537.
64. UEHARA T., YANAGIMACHI R., 1976 – Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biology of Reproduction* 15, 467-470.
65. VINCENT C., PICKERING S.J., JOHNSON M.H., 1990 – The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucid requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *Journal of Reproduction and Fertility* 89, 253-259.
66. WANG B., BALDASSARRE H., PIERSON J., COTE F., RAO K.M., KARATZAS C.N., 2003 – The in vitro and in vivo development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa. *Zygote* 11, 219-227.
67. WANG W.H., ABEYDEERA L.R., CANTLEY T.C., DAY B.N., 1997 – Effect of porcine maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* 111, 101-108.
68. WU J., CARRELL D.T., WILCOX A.L., 2001 – Development of in vitro-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction* 65, 1579-1585.
69. YAMAUCHI Y., YANAGIMACHI R., HORIUCHI T., 2002 – Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biology of Reproduction* 67, 534-539.
70. YONG H.Y., HONG J.Y., KANG S.K., LEE B.C., LEE E.S., HWANG W.S., 2005 – Sperm movement in the ooplasm, dithiothreitol pretreatment and sperm freezing are not required for the development of porcine embryos derived from injection of head membrane-damaged sperm. *Theriogenology* 63, 783-794.
71. YONG H.Y., PYO B.S., HONG J.Y., KANG S.K., LEE B.C., LEE E.S., HWANG W.S., 2003 – A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3-4 µm diameter injection pipette. *Human Reproduction* 18, 2390-2396.
72. YOO J.G., HUR C.G., PARK M.R., PARK J.Y., HWANG K.C., KIM J.H., KIM J.H., CHO S.K., 2012 – Electrical activation enhances pre-implantation embryo development following sperm injection into *in vitro* matured pig oocytes. *The Japanese Society of Veterinary Science* 74, 429-434.
73. YOSHIKAWA M., WATANABE H., FUKUI Y., 2009 – Effects of the presence and the numbers of corpora lutea in nondelivered and delivered pigs on in vitro oocyte maturation and embryonic development. *Journal of Reproduction and Development* 55, 655-660.
74. ZANIBONI A., MERLOA B., ZANNONIA A., BERNARDINI C., LAVITRANO M., FORNIA M., GAETANO M., BACCI M.L., 2013 – Expression of fluorescent reporter protein in equine embryos produced through intracytoplasmic sperm injection mediated gene transfer (ICSI-MGT). *Animal Reproduction Science* 137, 53-61.

Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) as an alternative to standard in vitro fertilization in pigs

Summary

Injection of sperm into the oocyte cytoplasm (ICSI) is a method of assisted reproduction that has been used for in vitro production of embryos in animals and treatment of infertility in humans. ICSI makes it possible to eliminate polyspermy and to use sperm as vectors of exogenous DNA to obtain transgenic animals. It aids in the creation of biodiversity conservation programmes and in understanding mechanisms taking place during fertilization and early embryonic development. Fertilization by ICSI is performed using IVM, *in vivo* and cryopreserved oocytes and ejaculated or epididymal semen, fresh or preserved. Sperm injection is carried out using an inverted microscope equipped with a micromanipulator attached to the holding and injection pipettes. After injection, the oocytes are artificially activated and cultured in vitro. The embryos obtained are evaluated. Despite the potential of ICSI, there are still problems limiting its implementation for in vitro production of embryos on a commercial scale. Factors that may influence the efficiency of ICSI are oocyte and sperm quality and their preparation for fertilization, damage to the oocyte during injection, toxicity of compounds used to slow the sperm, and oocyte activation after injection. The number of embryos obtained as a result of ICSI fertilization is low and their quality is often reduced. Further studies are needed to optimize not only the fertilization technique, but also its individual stages, i.e. in vitro maturation of oocytes and sperm preparation.

KEY WORDS: ICSI / pig / oocyte / sperm