

ИНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧНИ ИНЖЕКЦИИ НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ НЕРЕЗ

ЯНЧО ТОДОРОВ, ТАНЯ ТОДОРОВА
Институт по животновъдни науки - Костинброд

Интрацитоплазматичната инжекция се разглежда като специален вид *in vitro* оплождане, при което единичен сперматозоид се инжектира директно в цитоплазмата на матурирана яйцеклетка. Чрез инжектирането се избягват важни елементи на физиологичното оплождане, напр. капацитацията, акрозомната реакция и пенетрацията. Използваните сперматозоиди може да не са напълно функционални. В сравнение с другите техники за *in vitro* оплождане, ICSI осигурява винаги моноспермично оплождане. В хуманната медицина методът намира приложение за терапия на мъжкия инфертилитет.

При някои видове животни проблемът с криоконсервацията е основна пречка пред прилагането на основни репродуктивни методи (като напр. дългосрочно съхраняване на семенен материал, *in vitro* оплождане и др.). Яйцеклетките и сперматозоидите при свинете не понасят охлаждане и/или замразяване поради високото съдържание на липиди в мембраните. За *in vitro* експерименти се използват епидидимални сперматозоиди, които се нуждаят от по – дълго време на капацитация.

При животните ICSI може да се използва за създаване на трансгенни животни, при което инжектираният сперматозоид се зарежда с определен генен конструкт и се използва като вектор (Squires, 1999; Kim and Shim, 2000). Освен това ICSI техниката е ефикасен метод за оптимално използване на генетичен материал, напр. поддържане на редки породи, но също така и за получаване на определени развъдни линии (Pope et al., 1998). Интересна възможност е прилагането на ICSI със сексирани по флоуцитометричен път сперматозоиди. Това е особено актуално при свинете, при които чрез сортиране не могат да се получат достатъчен брой сперматозоиди за нормално оплождане. Използването на сексирани сперматозоиди при стандартни IVF техники е съпроводено с висок процент полиспермия (Seidel and Johnson, 1999; Pereyra-Bonnet et al., 2007).

ICSI техниките започват да се развиват през 60-те години на миналия век, като първите опити се провеждат с амфибии. Hosoi et al. (1988) първи прилагат успешно ICSI техниката при бозайници (зайци). През 90-те години техниката се развива бързо и са получени приплоди при човек (Van Steirteghem et al., 1993), мишка (Kimura et al., 1995), овца (Gomez et al., 1998a) и кон (McKinnon et al., 1998). Kolbe and Holtz (2000) първи докладват за

успешно прилагане на ICSI при свине. От тези експерименти става ясно, че степента на зрелост на сперматозоидите не играе решаваща роля при ICSI. Yazawa et al. (2001) установяват, че моделът на калциевите осцилации, предизвикан от незрели сперматозоиди силно наподобява модела, наблюдаван при партеногенетична активация. Heuwieser et al. (1992a) постигат висока степен на оплождане при ICSI с дефектни или морфологично изменени сперматозоиди от бик. Hosoi et al. (1999) сравняват прилагането на интактни сперматозоиди с главички от сперматозоиди и доказват, че яйцеклетките инжектирани с главички от сперматозоиди се развиват в много по-малка степен. Kim et al. (1999c) при свине постигат успех при инжектирането на сперматозоиди само след допълнителна активация на ооцитите.

Целта на изследването бе да се тества ефектът от инжектиране на еякулирани сперматозоиди в *in vitro* матурирани яйцеклетки, за да се установи степента на оплождане и развитие. Експериментите бяха проведени с използването на *in vitro* матурирани яйцеклетки и еякулирани и разредени сперматозоиди. За контрол бяха използвани инжектирани с разредител и неинжектирани яйцеклетки. След култивиране във FTM (Fert Talp Medium) в продължение на 20 h, инжектираните и контролните яйцеклетки бяха оцветени и анализирани за развитието на пронуклеуси. Ако яйцеклетката съдържа един или повече пронуклеуси или се дели, тя се счита за партеногенетично активирана. Яйцеклетки с два пронуклеуса или два бластомера се считат за оплодени. Оплодените яйцеклетки се култивираха в среда NCSU 23 в продължение на 48 h. развитието бе отчетено след 48 h.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

In vitro матурация (IVM) на свински ооцити.

Получаване на незрели кумулузно – ооцитни комплекси.

При всички експерименти се използваха *in vitro* матурирани ооцити.

Незрелите кумулузно – ооцитни комплекси бяха изолирани от яйчници, получени в клиника. След промиване със затоплен физиологичен разтвор всички фоликули с размери 3–5 mm бяха пунктирани. След седиментация утаените ооцити се аспирираха и се промиваха два

пъти с PBS + 1% FCS. Седиментът се поставяше в петриев панички, съдържащи 10 ml PBS + 1% FCS и под стереомикроскоп се изолираха КОК. Изолираха се само комплекси, които имаха поне три слоя кумулусни клетки и хомогенна цитоплазма. Изолираните ооцити се поставяха в малка петриева паничка съдържаща 2 ml PBS + 1% FCS до започване на матурацията.

***In vitro* матурация**

За *in vitro* матурацията бе използван NCSU 37 медийум, обогатен с фоликуларна течност, изолирана от незрели фоликули, инсулин, цистеин, глутамин, EGF и меркаптоетанол и стерилно филтриран. Във всяко гнездо бяха поставени по 500 μ l среда, покрита с течен парафин и еквилибрирана при 38.5°C и 5% CO₂ в продължение на няколко часа. Селектираните КОК бяха промити пет пъти в еквилибрираната среда и култивирани в групи по 50 в 500 μ l NCSU 37. През първите 24 h на култивирането към средата бяха добавени db-cAMP, както и гонадотропните хормони PMSG и hCG. През вторите 24 h от култивирането ооцитите бяха поставени в NCSU 37 без добавка на PMSG, hCG и db-cAMP. Общата продължителност на матурацията беше 44-48 h. След приключване на матурацията ооцитите бяха денудирани от кумулусните клетки чрез механично пипетиране в PBS + 1 % FCS. До манипулацията ооцитите бяха поставени в инкубатор в 2 ml PBS + 10 % FCS.

При всички експерименти бе използвана семенна течност от един нерез. За ICSI процедурата спермата бе разреждана до концентрация от 3-5 x 10⁵ сперматозоида на милилитър.

Интрацитоплазматична инжекция на сперматозоиди (ICSI)

За ICSI процедурата бе използван микроскоп, оборудван с НМО (Hoffmann Modulation Optic) за по – добър контраст и с нагревателна масичка за поддържане на температура от 38.5°C. В средата на петритото се поставя 10 μ l капка от 10% PVP. Поради високия си вискозитет PVP забавя движенията на сперматозоидите и улеснява имобилизирането и инжектирането им. Около капката с PVP се накапват 10 капки PBS + 10% FCS от по 20 μ l всяка. Всички капки се покриват с течен парафин. Във всяка капка се поставя по една яйцеклетка за инжектиране. В капката с PVP се поставя около 5 μ l от спермалната суспензия. Подбира се под микроскопа сперматозоид с добра подвижност и без морфологични дефекти. След това се засмуква в иглата с опашката напред и с възможно най - малко PVP. Пипетата прониква до около две трети от диаметъра на яйцеклетката и за да се осигури пенетрацията на оолема се извършва аспирация на цитоплазма в инжекционната игла. В момента, в който ас-

пирираната цитоплазма започне да се придвижва бързо в инжекционната игла, аспирацията се спира и сперматозоидът се инжектира внимателно в цитоплазмата като се внимава да се вкара възможно най-малко количество среда с PVP.

Контролната група бе третирана по същия начин, само при инжектирането се вкарваше среда с PVP. Яйцеклетките от контролната група неподложени на инжектиране бяха манипулирани по същия начин. До култивирането яйцеклетките се държаха във PBS + 10 % FCS в инкубатор при 38.5 °C и 5% CO₂ във въздух.

***In vitro* култивиране**

Култивирането на яйцеклетките от опитната и контролните групи през първите 20 h бе извършено във FTM и след това в NCSU 23. Яйцеклетките бяха промити трикратно във FTM и поставени в 100 μ l капки еквилибриран FTM, покрити с течен парафин. След 20 h култивиране яйцеклетките бяха промити три пъти в NCSU 23 и култивирани в 100 μ l капки от същата среда при 38.5 °C и 5 % CO₂ във въздух. След 48 h култивиране беше установена степента на делене и дялящите се ембриони култивирани в NCSU 23 в продължение на 120 h.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В табл. 1 са показани резултатите от деленето при опитната и контролните групи след 48 h култивиране. Яйцеклетките, инжектирани със сперматозоиди показва достоверно по - голяма степен на делене ($P < 0.001$) в сравнение с двете контролни групи. Инжектираната контролна група не се различаваше достоверно в партеногенетичното си развитие от неинжектираната контролна група ($P > 0.05$).

В табл. 2 са показани резултатите от различните степени на развитие на опитните и контролните групи след 48 h *in vitro* култивиране с диференциране чрез броя на бластомерите.

Всички ооцити, които след култивиране в продължение на 48 h не бяха разделени, бяха оцветени с ацето-орцеин, за да се проследи пронуклеарната конфигурация и да се диференцират оплодените, но неразделени яйцеклетки от партеногенотите. Резултатите са показани в табл. 3

В групата, обозначена като неопределени, са включени яйцеклетки, при които не се наблюдаваха обособени ядрени конфигурации и се приемат като клетки с начални признаци на дегенерация. Степента на делене на инжектираните ооцити при нашите експерименти бе задоволителна. Резултатите са сравними с резултатите на други автори. Разликата между оплодените и активираните ооцити е много малка, което може да се дължи на по - висока степен на активация. **Martin** (2000) използва при своите експерименти с ICSI само *in vivo* матурирани

Таблица 1. Степени на оплождане (%) при инжектирани със сперматозоиди, контролно инжектирани и неинжектирани яйцеклетки 48 часа след ICSI.

Table 1. Fertilization rates (%) of injected, control injected and not injected eggs 48 hours after ICSI

Групи Groups	Ооцити Oocytes <i>n</i>	Степен на делене, % Development rates $x \pm SD$	
ICSI	155	43.6 ^a	± 11.7
Контрол Control	130	18.2 ^b	± 11.3
Неинжектирани Not injected	126	17.3 ^c	± 10.1

a : b : c $P < 0.001$; b : c $P < 0.05$

Таблица 2. Степен на развитие на инжектирани, контролни и неинжек-тирани ооцити 48 h след ICSI

Table 2. Development rates (%) of injected, control injected and not injected eggs 48 hours after ICSI

Групи Groups	2– бластомера (blastomeres) $x \pm SD$	4 – бластомера (blastomeres) $x \pm SD$	>4-бластомера (blastomeres) $x \pm SD$	Неразделени (Not injected) $x \pm SD$
ICSI	23.85 ^a ± 11.37	15.58 ^a ± 7.37	4.19 ^a ± 6.37	56.39 ^a ± 11.75
Контрол Control	6.44 ^b ± 9.05	2.08 ^b ± 5.89	9.63 ^b ± 6.91	81.85 ^b ± 11.3
Неинжектирани Not injected	8.45 ^c ± 6.79	2.22 ^c ± 4.28	6.58 ^c ± 7.67	82.75 ^c ± 10.09

a : b : c $P < 0.001$; b : c $P < 0.05$

Таблица 3. Пронуклеарна конфигурация на третирани но неразделени яйцеклетки

Table 3. Pronuclear configuration of treated but not divided eggs

Групи Groups	ана–телофаза II ana- telophasa II $x \pm SD$	2 пронуклеуса 2 pronuclei $x \pm SD$	МII $x \pm SD$	Неопределени not defined $x \pm SD$
ICSI	4.5 ± 5.6 ^a	19.6 ± 12.26 ^a	16.2 ± 10.1 ^a	16.2 ± 5.6
Контрол Control	10.7 ± 8.1 ^b	0.0 ^b	49.6 ± 12.8 ^b	21.6 ± 4.2
Неинжектирани not injected	12.2 ± 12.5 ^c	0.7 ± 2.1 ^c	57.0 ± 9.5 ^c	12.8 ± 8.6

a : b : c $P < 0.001$; b : c $P < 0.05$

ооцити, чийто потенциал за развитие се приема като по – добър. Общите резултати ни водят до извода, че нашата техника за ICSI се нуждае от подобряване (Pereyra-Bonnet, 2008). Ние предполагаме, че проблемът е по – скоро в системата за *in vitro* култивиране. Голям процент от ембрионите спираха развитието си на стадий 4 – бластомера, което според Bavister (1995) се дължи на дефицити в средата за култивиране. Klocke (1999) също докладва за подобни проблеми. Това може да се дължи и на факта, че яйцеклетките, оплодени чрез инжектиране на сперматозоид, са подложени на значително по – голям стрес в сравнение с яйцеклетките, оплодени чрез конвен-

ционални IVF методи и това ги прави по - чувствителни към субоптимални условия на култивиране. Проблемите може да се дължат на промени в мембраните на сперматозоидите, предизвикани от обработката им и престоя в PVP. Много автори твърдят, че моментното състояние на сперматозоида напр. капацитиран или не, в различен стадий на зрелост и др. не влияят на резултатите от ICSI (Galli et al., 1999; Nakai et al., 2009). Тези фактори изискват по - сериозно изследване, особено при свинете, при които данните от прилагане на ICSI са сравнително малко, в сравнение с други видове животни и особено при човека. Тези експерименти могат да помогнат при

прилагането на метода за инжектиране на сексирани сперматозоиди, получаване на трансгенни животни за ксено-трансплантация и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Bavister, B. D.**, 1995. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum. Reprod.* 1, 91-148.
2. **Galli, C., G. Crotti, C. Notari, G. Lazzari**, 1999. High rate of activation and fertilisation following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in cattle. *Theriogenology* 51, 355 (Abstr.).
3. **Gomez, M. C., J. W. Catt, G. Evans, W. M. C. Maxwell**, 1998a. Cleavage development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology* 49, 1143-1154.
4. **Gomez, M. C., J. W. Catt, L. Gillan, G. Evans, W. M. C. Maxwell**, 1997. Effect of culture, incubation, and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Reprod. Fertil.** 9, 665-673.
5. **Hosoi, Y., M. Miyake, K. Utsumi, H. Iritani**, 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. In: 11. Kongr. Int. Anim. Reprod. And AI, Dublin, Ireland 1988. Kongr. Ber., Bd. 3, S. 331.
6. **Heuwieser, W., X. Yang, S. Jiang, R. H. Foote**, 1992a. A comparison between in vitro fertilization and microinjection of immobilized spermatozoa from bulls producing spermatozoa with defects. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 489-491.
7. **Pereyra-Bonnet, F., Fernández-Martín R, Olivera R, Jarazo J, Vichera G, Gibbons A, Salamone D.**, 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species., *Reprod Fertil Dev.* 20(7):741-9.
8. **Pope, C. E., C. A. Johnson, M. A. McRae, G. L. Keller**, 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 53, 221-236.
9. **Kim, N. H., H. Shim**, 2000. Intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Embryo Transfer Newsletter* 18, 10-13.
10. **Kim, N. H., J. S. Shin, C. Kim, S. H. Jun, H. T. Lee, K. S. Chung**, 1999c. Fertilization and in vitro development of porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection of round spermatid or round spermatid nuclei. *Theriogenology* 51, 1441-1449.
11. **Kimura, Y., R. Yanagimachi**, 1995. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 121, 2397-2405.
12. **Kolbe, T., W. Holtz**, 2000. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Anim. Reprod. Sci.* 64, 97-101.
13. **Klocke, S.**, 1999. Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) in vivo und in vitro gereifter porziner Oozyten mit Nebenhodenschwanzspermien und flowzytometrisch geschlechtsspezifisch sortierten Eberspermien. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
14. **Kobayashi M., Asakuma S., Fukui Y.**, 2007. Blastocyst production by in vitro maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection, *Zygote.* May;15(2):93-102.
15. **McKinnon, A. O., O. Lacham-Kaplan, A. O. Trounson**, 1998. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen/thawed spermatozoa into in vivo matured mare oocytes. In: 7. International Symposium of Equine reproduction University of Pretoria, South Africa 1998. Kongr. Ber., S. 137.
16. **Martin, M.**, 2000. Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63, 109-112.
17. **Nakai M., Ito J., Sato K., Noguchi J., Kaneko H., Kashiwazaki N., Kikuchi K.**, 2009. 270 pretreatments of porcine sperm before intracytoplasmic sperm injection affect quantity of plczeta, *Reprod Fertil Dev.* 21(1):232-3
18. **Squires E, J.**, 1999. Status of sperm-mediated delivery methods for gene transfer. In: Murray, J.D, G.B. Anderson, A.M. Oberbauer, M.M. McGloughlin (Hrsg.): *Transgenic animals in agriculture.* CABI Publishing, Oxon, New York, S. 87-95.
19. **Seidel, G. E., L. A. Johnson**, 1999. Sexing mammalian sperm – overview. *Theriogenology* 52, 1267-1372.
20. **Tesarik, J., C. Mendoza**, 1996. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum. Reprod.* 11, 772-779.
21. **Van Steirteghem, A. C., J. Liu, H. Joris, Z. Nagy, C. Janssenswillen, H. Tournaye, M. P. Derde, E. VAN Assche, P. Devroey**, 1993. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod.* 8, 1055-1060.
22. **Yazawa, H., K. Yanagida, A. Sato**, 2001. Oocyte activation and Ca(2+) oscillation-inducing abilities of mouse round/ elongated spermatids and the development capacities of embryos from spermatid injection. *Hum. Reprod.* 16, 1221-1228.

INTRACYTOPLASMATIC INJECTIONS USING
EJACULATED BOAR SPERM

I. Todorov, T. Todorova

Institute of Animal Science - Kostinbrod

SUMMARY

The study was to test the effect of the injection of ejaculated boar sperm in in vitro matured oocytes and determine the fertilization and development rates. Experiments were performed with the use of in vitro matured oocytes and ejaculated and diluted sperm. Controls groups were injected with diluent and non-injected oocytes. After culturing in FTM (Fert Talp Medium) for 20 hours, the injected oocytes and controls were stained and analyzed for the development of the pronuclei. Fertilized eggs were cultured in NCSU 23 for 48 hours. Evolution was noted at 48 hours.

From the injected oocytes 43.6% were fertilized and began dividing. Only 4.19% continued development over 4 blastomeres.

The results were encouraging, but require more rigorous testing, particularly for pigs in which the data from the application of the ICSI is relatively small as compared to other species, especially in man.