



Використання полівінілалкоголю та полівінілпіролідону для підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до запліднення методом ICSI

О. Ю. Лизогуб

oksanalyzohub@gmail.com

Інститут розведення та генетики тварин імені М. В. Зубця НААН,
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321, Україна

Метою роботи було вивчити вплив середовищ з ПВП (полівінілпіролідон) та ПВА (полівінілалкоголь) на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та їх підготовку до штучного запліднення для оптимізації біотехнологічних методик. У дослідженнях використано еякульовані кріоконсервовані сперматозоїди кнура миргородської породи Дніпро 641. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ імені М. В. Зубця НААН упродовж восьми років. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв. до повного розморожування. Відокремлення сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили за допомогою методу *swim up* у середовищі *Sp-TALP*. Після перебування сперматозоїдів в 10,0%-му розчині ПВП протягом 10 хв. рухливість знизилась на 68,2% ($P<0,05$) і становила 3,4%, а через наступні 10 хв. інкубації знизилась до 1,4% ($P<0,01$), що в 10 разів нижче порівняно з початковою рухливістю. У 10,0%-му розчині ПВА рухливість через 10 хв. інкубації знизилась на 37,4% ($P<0,05$) становила 6,7%, а ще через 10 хв. знизилась до 5,7% ($P<0,01$), що в 1,8 раза нижче порівняно з початковою рухливістю. Встановлено, що в разі застосування 10,0%-го розчину ПВП еякульовані деконсервовані сперматозоїди кнура втрачають рухливість на 86,9% ($P<0,01$) від початкової рухливості, що унеможлиблює процес вибору придатного сперматозоїда для запліднення методом ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*). Встановлено, що 10,0%-ий розчин ПВА можна застосовувати для проведення іммобілізації сперматозоїдів кнурів, оскільки він знижує рухливість на 46,7% ($P<0,01$) від початкової рухливості сперматозоїдів. Доведено, що рухливість під час інкубації деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнура у 5,0%-ому розчині ПВА знижується лише на 28,0% ($P<0,01$) від початкової, що є оптимальним за використання кріоконсервованих сперматозоїдів кнура, матеріал яких є в обмеженій кількості та зручним для оператора і безпечним для ооцитів.

Ключові слова: ICSI, рухливість сперматозоїдів, ооцит, полівінілпіролідон, полівінілалкоголь, ембріони свиней

Для отримання ембріонів свиней найчастіше застосовують методику IVF (*In Vitro Fertilization*), яка є дешевою і технічно простішою. Але якщо кріоконсервовані матеріал наявний в обмеженій кількості, проведення такого методу дослідження є неможливим. Методика ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) сьогодні є унікальною процедурою, завдяки якій можна отримати ембріон, використовуючи один ооцит та один сперматозоїд. Одним з важливих етапів ICSI є знерухомлення сперматозоїдів, яке проводять з використанням розчину ПВП. Незважаючи на його широке

використання, цей розчин негативно впливає на розвиток ооцитів і непридатний для іммобілізації сперматозоїдів кнурів. Розчин ПВА має схожі характеристики в'язкості, але використовується як безпечний агент для культивування ембріонів в невеликих концентраціях, тому є перспективною альтернативою ПВП для використання під час ICSI.

Ін'єкція сперматозоїдів у цитоплазму яйцеклітин ICSI є методом допоміжного розмноження, який використовують для отримання ембріонів *in vitro* у тварин і лікування безпліддя у людей. ICSI забезпечує уник-

нення поліспермії та використання сперматозоїдів як векторів екзогенної ДНК для отримання трансгенних тварин. Ця методика застосовується для реалізації програм збереження біорізноманіття, розуміння механізмів і процесів запліднення та вивчення раннього ембріонального розвитку [15, 18].

Головною перевагою запліднення за допомогою ICSI є можливість використання сперми зі зниженою концентрацією або зниженою рухливістю сперматозоїдів, сексованої чи кріоконсервованої або у разі використання сперматозоїдів із придатків сім'яників (епідидиміс) після забою чи загибелі плідника. У свиней IVF призводить до поліспермного запліднення понад 50% яйцеклітин, що істотно знижує ефективність отримання ембріонів *in vitro* [6]. Тому є гостра необхідність щодо застосування цього методу окрема і для усунення поліспермії [20].

Отримання ембріонів свиней — один з найважливіших заходів, необхідних для збереження різноманіття цього виду тварин. Крім того, свині є важливою експериментальною моделлю через їхню біологічну схожість з людиною і можуть бути потенційними донорами органів для ксенотрансплантацій. Тому надзвичайно важливо оптимізувати процеси запліднення ооцитів свиней *in vitro* та отримання максимально високого рівня формування та розвитку ембріонів [3, 8].

Основні аспекти процедури ICSI на сьогодні охоплюють іммобілізацію сперматозоїда через пошкодження джгутика, аспірацію його в ін'єкційну піпетку, аспірацію цитоплазми та безпосередню ін'єкцію сперматозоїда в ооцит [14]. Іммобілізація сперматозоїда — критично важливий етап для успішного запліднення, оскільки вона необхідна для вивільнення розчинних факторів сперми, які індукують активацію ооцитів, що передують процесу утворення веретена поділу [2, 13, 20].

Результати щодо застосування ICSI у свиней наразі мають суперечливі дані [16]. У роботах Yong H. Y. et al. [20] та Li X.X. et al. [7] після запліднення методом IVF отримано роздроблених ембріонів на другу добу розвитку на рівні 53,2 та 88,2% відповідно, а після запліднення методом ICSI результативність була нижчою в обох випадках — відповідно, 48,7 та 85,1%. Різниця між методами ICSI та IVF спостерігалася під час застосування бластоцистної культури, а саме дорощування ембріонів від третьої до п'ятої доби розвитку, що є додатковим методом селекції для визначення найбільш життєздатних ембріонів. У цих дослідженнях відсоток сформованих бластоцист після запліднення *in vitro* за допомогою ICSI був майже удвічі нижчим (10,5 та 20,2% відповідно) порівняно з результатами сформованих бластоцист після IVF (19,4 та 35,2% відповідно). У дослідженнях Wu J. et al [18] за допомогою ICSI було отримано більше ембріонів (51,0%), ніж за допомогою IVF (45,0%). Кількість отриманих бластоцист була вищою під час запліднення методом ICSI (21,0%), ніж під час IVF (16,0%).

За результатами досліджень Mandryk I. [9] встановлено, що запліднення методом ICSI не є оптимізованою методикою, а результативність за її використання може коливатися від 37,5 до 53,3% отриманих ембріонів. Кількість отриманих бластоцист може збільшуватись (або зменшуватись) на 15,8% в разі застосування одного і того ж методу запліднення, а саме ICSI. Але існують випадки, коли запліднення методом ICSI є необхідним через обмежену кількість гамет. Зниження результатів під час такого методу запліднення пов'язують з низкою чинників, серед яких використання сполуки полівінілпіролідону (ПВП) для знерухомлення сперматозоїдів [10, 12].

Для знерухомлення сперматозоїдів використовують 10% розчин ПВП. Він часто застосовується під час ICSI, щоб сповільнити активність сперматозоїдів та контролювати рух рідини в ін'єкційній піпетці, попри його згубний вплив на розвиток ооцитів [5, 7]. Застосування ПВП також запобігає налипанню сперматозоїдів та клітинного дебрису на піпетку, що полегшує проведення процедури [17]. Однією з можливостей покращити метод ICSI є модифікований метод ін'єкції сперматозоїда з використанням ПВА замість ПВП.

На відміну від шкоди ПВП для гамет, сполука ПВА не дає негативних ефектів на ооцити. Yong H. Y. et al. показали, що доволі успішно цю сполуку використовують в невеликих концентраціях у культуральних середовищах навіть для тривалого культивування ембріонів свиней [1, 20].

Використання ПВП для проведення процедури ICSI спричинене тим, що це найбільш густий та в'язкий розчин для цих цілей. Під час використання такого розчину сперматозоїди достатньо сповільнюються для того, щоб їх можна було оцінити, вибрати морфологічно найправильніший та знерухомити. Але, оскільки сперматозоїди кнурів відрізняються від сперматозоїдів інших видів за розмірами, а також для сперматозоїдів вказаного виду тварин не характерний прямолінійний рух, сперматозоїди кнурів мають специфічний рух (рис. 1) та досить невисоку швидкість.

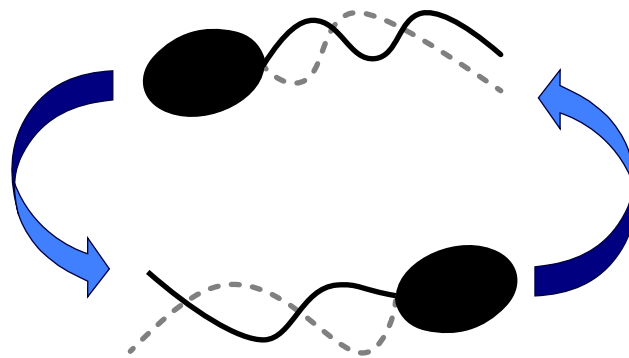


Рис. 1. Траєкторія руху сперматозоїдів кнурів
Fig. 1. The trajectory of boar sperm

Для проведення процедури ICSI у свиней не потрібно значно сповільнювати рух, оскільки зловити сперматозоїд не настільки проблематично [19]. Тому знерухомлення сперматозоїдів кнурів в розчині ПВА простіше і легше, ніж за використання його для інших видів тварин, і абсолютно прийнятне для застосування під час запліднення методом ICSI різних порід свиней.

Ще одним важливим аспектом під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення є здатність розчину запобігати налипанню дебрису і нерухомих сперматозоїдів всередині та зовні піпетки. Треба зазначити, що найважливішим нюансом є ризик залипання сперматозоїда всередині ін'єкційної піпетки, яке може створити проблему під час самої ін'єкції, що, у свою чергу, призведе до дегенерації ооцита. Такий хімічний реагент, як ПВП, запобігає виникненню наведених вище неприпустимих випадків, тому розчин ПВА теж повинен мати такі властивості, щоб процедура була атравматичною для ооцитів.

Для уникнення негативних ефектів, пов'язаних із застосуванням ПВП, можна застосовувати середовище з додаванням ПВА, яке також може тримати стінку та порожнину ін'єкційної піпетки менш липкою упродовж довшого проміжку часу, ніж при проведенні іммобілізації сперматозоїдів без цього розчину [4]. В результаті можна досягти такого ефекту, який ми спостерігаємо за використанням ПВП — менше прилипання мінеральної олії та шматків клітин до ін'єкційної піпетки, але водночас не шкодити гаметам [20]. Тому метою роботи було вивчити вплив середовищ з ПВП та ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та підготовку їх до штучного запліднення для оптимізації біотехнологічних підходів.



Рис. 2. Чашка Петрі з доріжками 10,0% розчинів ПВП та ПВА
Fig. 2. Petri dish with lanes of 10.0% PVP and PVA solutions

Матеріали і методи

У дослідженнях використано еякульовані кріоконсервовані сперматозоїди кнура миргородської породи *Дніпро 641*. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М. В. Зубця НААН упродовж восьми років. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв до повного розморожування. Відокремлення сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили за допомогою методу *swim up* у середовищі *Sp-TALP*. Для цього розташовували пробірку з 2 мл теплої середовища під кутом 45° . На дно пробірки підшарували 0,2 мл розмороженої суспензії сперматозоїдів і на 15 хв. залишали в термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$. Після інкубації отриману суспензію сперматозоїдів розріджували середовищем *Sp-TALP* до концентрації $1\text{--}5 \times 10^7$ сперматозоїдів в 1 мл.

Для тестування 10,0% розчинів ПВП (*Origio*, Данія) та ПВА (*Sigma*, P8136, США) підготовлювали чашку Петрі ($d=35$ мм) з двома доріжками цих середовищ і покривали мінеральною олією *LiteOil* (*GlobalLife*, США) (рис. 2). Чашку Петрі з розчинами попередньо розміщували в термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$ впродовж 60 хв. Для оцінки рухливості сперматозоїдів вносили 10 мкл відмитої суспензії сперматозоїдів у 10,0% розчини ПВП та ПВА. Після цього оцінювали рухливість в 10 полях зору за збільшення в 400 разів.

Для дослідження швидкості руху сперматозоїдів використовували ін'єкційну піпетку діаметром 5,0 мкм (*Cook*, США). Експеримент проводили в трьох повторях.

Другим етапом досліджень було оцінити вплив різних концентрацій розчину ПВА на рухливість сперматозоїдів. У дослідженнях було використано чотири концентрації: 0, 1; 1,0; 5,0 та 10,0%-ий розчини ПВА.

Для всіх зразків проводили обчислення середнього арифметичного значення і значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$). Отриманий цифровий матеріал статистично опрацьовували із застосуванням пакету програм *Microsoft Office Excel 2010*.

Результати й обговорення

Перший етап досліджень передбачав оцінку можливості застосування 10,0%-их розчинів ПВП і ПВА в разі запліднення методом ICSI; ми досліджували рухливість сперматозоїдів через 10 і 20 хв. після розміщення їх у досліджувані розчини. Це той проміжок часу, який необхідний для проведення запліднення 10 ооцитів в одній чашці задля зниження часової паузи перебування гамет поза інкубатором. Для запліднення більшої кількості ооцитів використовуються додаткові чашки; відповідно, суспензія

сперматозоїдів розміщується заново у нові чашки з чистими розчинами ПВП чи ПВА. Також було протестовано зручність проведення процедури для оператора, а саме відсутність залипання в піпетці клітин та дебрису, що є важливим елементом під час процедури ICSI.

Встановлено, що після розморожування рухливість сперматозоїдів кнурів становила 10,7%. Після перебування сперматозоїдів в 10,0%-му розчині ПВП впродовж 10 хв. рухливість знизилась на 68,2% ($P < 0,05$) і становила 3,4%, а через наступні 10 хв. інкубації знизилась до 1,4% ($P < 0,01$), що в 10 разів нижче порівняно з початковою рухливістю. В 10,0%-му р-ні ПВА рухливість через 10 хв. інкубації знизилась на 37,4% ($P < 0,05$) і становила 6,7%, а ще через 10 хв. знизилась до 5,7% ($P < 0,01$), що в 1,8 раза нижче порівняно з початковою рухливістю (табл. 1).

Другий етап досліджень був спрямований на оцінку впливу різних концентрацій розчину ПВА на рухливість кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів (табл. 2). Використовували чотири концентрації розчину ПВА: 0,1; 1,0; 5,0 та 10,0%.

Таблиця 1. Вплив 10,0%-их розчинів ПВП та ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнурів
Table 1. The effect of 10.0% solutions of PVP and PVA on the motility of deconserved boar sperm

Показники Parameters	Рухливість сперматозоїдів / Sperm motility, %		
	відразу після впорскування Immediately after adding	через 10 хв. after 10 min	через 20 хв. after 20 min
ПВП / PVP, 10,0%	10,7±1,71	3,4±0,86*	1,4±1,3**
ПВА / PVA, 10%	10,7±0,86	6,7±1,71*	5,7±0,65**

Примітка. Тут і в наступній таблиці * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$ порівняно із початковою рухливістю.

Note. Here and in the following table * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$ compared to the initial motility.

Таблиця 2. Вплив різних концентрацій ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнурів
Table 2. Influence of different concentrations of PVA on the motility of deconserved boar sperm

Показники Parameters	Рухливість сперматозоїдів / Sperm motility, %		
	відразу після впорскування immediately after adding	через 10 хв. after 10 min	через 20 хв. after 20 min
10,0%	10,7±0,86	6,7±0,86*	5,7±0,86*
5,0%	10,7±0,86	8,4±0,65**	7,7±0,86*
1,0%	10,7±0,86	9,4±1,71*	9,4±0,65**
0,1%	10,7±0,86	10,7±0,86*	9,7±0,65**

Через 10 хв. інкубації найнижчу рухливість сперматозоїдів спостерігали в 10,0%-му розчині ПВА — вона становила 6,7%, що на 1,7 та 2,7% ($P < 0,05$, $P < 0,01$) нижче порівняно з 5,0%-им та 1,0%-им розчинами ПВА відповідно. Варто зазначити, що рухливість сперматозоїдів в 0,1%-му розчині ПВА через 10 хв. інкубації не змінилась і залишилась на рівні 10,7%.

Високі показники життєздатності сперматозоїдів кнурів були зафіксовані у 0,1%-му розчині ПВА. Через 20 хв. інкубації в цьому розчині рухливість залишалась достатньо високою і становила 9,7%, що на 9,4% нижче порівняно з початковою рухливістю.

Найнижчі показники життєздатності сперматозоїдів кнурів спостерігали в 10,0%-му розчині ПВА, тут цей показник становив 5,7%, що на 2,0; 3,7 та 4,0% ($P < 0,05$, $P < 0,01$) менше порівняно із 5,0, 1,0 та 0,1%-им розчинами ПВА відповідно.

Для успішного проведення процедури ICSI рухливий сперматозоїд механічно знерухоплюють за допомогою різних маніпуляцій з його хвостом: ударами ін'єкційної піпетки, енергійним поглинанням, кількома п'єзоімпульсами або повторюваною аспірацією в ін'єкційну піпетку і з неї. Для цього в більшості ембріологічних лабораторій використовують хімічний агент полівінілпіролідон — саме для уповільнення руху сперматозоїда і для полегшення пошкодження хвостика, незважаючи на переконливі дані щодо шкідливого впливу на виживання і розвиток ооцитів після процедури ICSI [20].

В'язкість розчинів ПВА та ПВП однакової концентрації є схожою, 20,0%-ий розчин ПВП за +25°C має в'язкість 0,084 Па/с, а 20,0%-й розчин ПВА має в'язкість 1,836 Па/с за тієї ж температури [11]. В'язкість — ключова характеристика, необхідна для сповільнення сперматозоїдів, тому під час досліджень з отримання ембріонів свиней методом ICSI ми протестували розчин ПВА в такій же концентрації, як і наявний комерційний розчин ПВП, тобто 10,0%-ий розчин.

Під час застосування 10,0%-го розчину ПВП для кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів ми спостерігали швидку втрату рухливості сперматозоїдів на 68,2% ($P < 0,01$) від початкової рухливості (10,7%). Такий результат може бути через те, що 10,0% розчин ПВП достатньо в'язкий, а сперматозоїди кнурів через особливості свого руху, особливо після кріоконсервації, недостатньо добре можуть рухатися у настільки в'язкому середовищі. Оскільки сперматозоїди кнурів мають низьку кріорезистентність, така втрата рухливості призведе до суттєвого зниження результатів запліднення *in vitro*, тому цей розчин не підходить для використання у репродукції свиней.

Альтернативою є застосування розчину ПВА для підготовки сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення. Розчин ПВА забезпечив повільне знерухоплення сперматозоїдів кнурів порівняно з розчином ПВП на 3,3 % через 10 хв. культивування і на 4,3% після 20 хв. культивування (табл. 1). У 10,0%-му

розчині ПВП за 10 хв. інкубації рухливість сперматозоїдів кнура знизилась до 3,4%, а в 10,0%-му розчині ПВА — до 6,7% ($P < 0,05$), що на 3,3% вище порівняно з показником рухливості в 10,0%-му розчині ПВП.

Через 20 хв. інкубації результати були ще разючішими — під час культивування в 10,0%-му розчині ПВП рухливість знижувалася до 1,4%, за той самий проміжок часу рухливість сперматозоїдів у 10,0%-му розчині ПВА становила 5,7% ($P < 0,01$).

Аналізуючи отримані дані після інкубації суспензії деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів у розчині ПВА з різними концентраціями, ми встановили, що розчин ПВА в концентрації 10,0% найменш вдалий порівняно з іншими концентраціями. Під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення в 10,0%-му розчині ПВА швидкість руху через 20 хв. знизилася до 5,7% ($P < 0,01$) і проводити ін'єкцію з точки зору всмоктування та випорскування сперматозоїда було б достатньо зручно. Але зниження рухливості є достатньо високим порівняно з іншими концентраціями, тому що часто після розморожування сперматозоїдів кнурів кількість рухливих сперматозоїдів і так є невисокою. Для проведення процедури запліднення методом ICSI необхідно знерухомити сперматозоїд, ми маємо вибирати саме рухливий для впевненості в тому, що він є живим, і знерухомлювати механічно ін'єкторною голкою.

За використання 0,1 та 1,0%-го розчинів ПВА через 20 хв. рухливість сперматозоїдів знизилася на 1,0 та 1,3% ($P < 0,01$) відповідно порівняно з початковою рухливістю. Але швидкість руху в ін'єкційній піпетці була зависокою, оскільки щільність розчину майже не змінилася і була такою ж, як і в культуральному середовищі. Занадто швидкий рух може пошкодити ооцити під час аспірування цитоплазми, що є необхідним етапом в разі проведення ICSI. Наслідком аспірування великої кількості цитоплазми може бути дегенерація ооцита. Також через велику швидкість впускання/випускання рідини можна ін'єкувати велику кількість розчину всередину ооцита, що негативно вплине на розвиток ембріона. Оптимальним розчином є 5,0%-ий розчин ПВА. Рухливість сперматозоїдів у цьому розчині становить 7,7% ($P < 0,05$) за 20 хв. інкубації. Швидкість руху знизилася, що спростило процедуру, до того ж процес запліднення у цьому випадку був безпечнішим для ооцита і для майбутнього ембріона.

Висновки

1. У разі застосування 10,0%-го розчину ПВП еякульовані деконсервовані сперматозоїди кнура втрачають рухливість на 86,9% ($P < 0,01$) від початкової рухливості, що унеможлиблює процес вибору придатного сперматозоїда для запліднення методом ICSI.

2. 10,0%-ий розчин ПВА можна застосовувати для проведення іммобілізації сперматозоїдів кнурів,

оскільки він знижує рухливість на 46,7% ($P < 0,01$) від початкової рухливості сперматозоїдів.

3. Рухливість за інкубації деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнура у 5,0%-ому розчині ПВА знижується лише на 28,0% ($P < 0,05$) від початкової, що оптимально під час використання кріоконсервованих сперматозоїдів кнура, матеріал яких наявний в обмеженій кількості, та зручно для оператора і безпечно для ооцитів.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження будуть скеровані на вивчення впливу об'єму середовища ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура для знерухомлення і застосування їх під час запліднення методом ICSI, розуміння механізмів і процесів запліднення та вивчення раннього ембріонального розвитку.

Дотримання етичних стандартів

Всіх міжнародних, національних і/або інституційних принципів догляду та використання тварин було дотримано.

1. Association of Clinical Embryologists. Guidelines on good practice in clinical embryology laboratories. *Human Fertil.* 2012; 15 (4): 174–189. DOI: 10.3109/14647273.2012.747891.
2. Avalos-Durán G, Cañedo-Del Ángel AME, Rivero-Murillo BJ, Zambrano-Guerrero JE, Carballo-Mondragón E, Checa-Vizcaíno MÁ. Physiological ICSI (PICS) vs. Conventional ICSI in couples with male factor: a systematic review. *JBRA Assist. Reprod.* 2018; 22 (2): 139–147. DOI: 10.5935/1518-0557.20180027.
3. Casillas F, Betancourt M, Cuello C, Ducolomb Y, López A, Juárez-Rojas L, Retana-Márquez S. An efficiency comparison of different *in vitro* fertilization methods: IVF, ICSI, and PICS for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocytes. *Porc. Health Manag.* 2018; 4: 16. DOI: 10.1186/s40813-018-0093-6.
4. Ding D, Wang Q, Li X, Chen B, Zou W, Ji D, Hao Y, Xue R, Zou H, Wei Z, Zhou P, Cao Y, Zhang Z. Effects of different polyvinylpyrrolidone concentrations on intracytoplasmic sperm injection. *Zygote.* 2020; 28 (2): 148–153. DOI: 10.1017/S0967199419000820.
5. Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod. Med. Biol.* 2012; 11 (4): 165–176. DOI: 10.1007/s12522-012-0126-9.
6. Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Bui WC. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2000; 63 (1): 242–250. DOI: 10.1095/biolreprod63.1.242.
7. Li XX, Lee DS, Kim KJ, Lee JH, Kim EY, Park JY, Kim MK. Leptin and nonessential amino acids enhance porcine preimplantation embryo development *in vitro* by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenol.* 2013; 79 (2): 291–298. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.08.019.
8. Macedo MP, Glanzner WG, Rissi VR, Gutierrez K, Currin L, Baldassarre H, Bordignon V. A fast and reliable protocol for activation of porcine oocytes. *Theriogenol.* 2018; 123: 22–29. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.021.

9. Mandryk-Grad I, Kosenyuk J, Gajda B. Developmental competence and quality of pig embryos obtained from standard *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012; 25 (1): 260–261. DOI: 10.1071/RDv25n1Ab225.
10. Nabi A, Entezari F, Miresmaeili SM, Vahidi S, Lorian K, Anbari F, Motamedzadeh L. Evaluation of sperm parameters and DNA integrity following different incubation times in PVP medium. *Urol. J.* 2022; 19 (3): 232–237. DOI: 10.22037/uj.v18i.6936.
11. Palermo GD, Nagy ZP (eds). *Manual of intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction with other advanced micromanipulation techniques to edit the genetic and cytoplasmic content of the oocyte*. Cambridge, Cambridge university press, 2021: 171 p. DOI: 10.1017/9781108887595.
12. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010; 27: 6–13. DOI: 10.1007/s10815-009-9380-0.
13. Petelak A, Krylov A. Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after intracytoplasmic sperm injection in pig. *Theriogenol.* 2019; 135: 115–120. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.014.
14. Pinto S, Carrageta DF, Alves MG, Rocha A, Agarwal A, Barros A, Oliveira PF. Sperm selection strategies and their impact on assisted reproductive technology outcomes. *Andrologia.* 2020; 53 (2): e13725. DOI: 10.1111/and.13725.
15. Rajska I. Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) as an alternative to standard *in vitro* fertilization in pigs. *Sci. Ann. Polish Soc. Anim. Prod.* 2015; 11 (3): 55–66. Available at: <http://rn.ptz.icm.edu.pl/wp-content/uploads/2016/12/Rajska-ang..pdf>
16. Ribas-Maynou J, Yeste M, Salas-Huetos A. The relationship between sperm oxidative stress alterations and IVF/ICSI outcomes: a systematic review from nonhuman mammals. *Biol.* 2020; 9 (7): 178. DOI: 10.3390/biology9070178.
17. Roychoudhury S, Maldonado-Rosas I, Agarwal A, Esteves S, Sharma R, Gupta S, Assidi M. Parthenogenetic activation and developmental potential of mouse oocytes after intracytoplasmic injection (ICSI) of PVP (polyvinylpyrrolidone) and HA (hyaluronic acid). *Fert. Steril.* 2016; 106 (3): E311. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.883.
18. Wu J, Carrell DT, Wilcox AL. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 2001; 65 (5): 1579–1585. DOI: 10.1095/biolreprod65.5.1579.
19. Yamochi T, Hashimoto S, Morimoto Y. Mural granulosa cells support to maintain the viability of growing porcine oocytes and its developmental competence after insemination. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021; 38: 2591–2599. DOI: 10.1007/s10815-021-02212-2.
20. Yong HY, Pyo BS, Hong JY, Kang KS, Lee BC, Lee ES, Hwang WS. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3–4 mm diameter injection pipette. *Human Reprod.* 2003; 18 (11): 2390–2396. DOI: 10.1093/humrep/deg442.

Usage of polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone for preparation of thawed ejaculated boar sperm for fertilization by ICSI

O. Ju. Lyzohub

oksanalyzohub@gmail.com

Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets NAAS,
1 Pogrebnyaka str, Chubynske village, Boryspil district, Kyiv Region, 08321, Ukraine

The aim of the study was to explore the effect of PVP (polyvinylpyrrolidone) and PVA (polyvinyl alcohol) media on deconserved ejaculated boar sperm and their preparation for artificial insemination to optimize biotechnological approaches. The studies used ejaculated cryopreserved sperm of a boar of the Myrhorod breed *Dnipro 641*. Genetic material was stored in the Bank of Genetic Resources of Animals IABG named after M. V. Zubets NAAS for eight years. The sperm suspension was thawed in a water bath at +37°C for 5 min until completely thawed. Separation of sperm from cryopreservative agent and diluent was performed using the *swim up* method in *Sp-TALP* medium. After the presence of sperm in the 10.0% solution of PVP for 10 min, motility decreased by 68.2% ($P < 0.05$) and amounted to 3.4%, and after the next 10 min of incubation decreased to 1.4% ($P < 0.01$), which is 10 times lower than the initial motility. In 10.0% of PVA motility after 10 min of incubation decreased by 37.4% ($P < 0.05$) and amounted to 6.7%, and after 10 min decreased to 5.7% ($P < 0.01$), which is 1.8 times lower than the initial motility. It was found that in the case of 10.0% of PVP solution ejaculated deconserved boar sperm lose motility by 86.9% ($P < 0.01$) from the initial motility, which makes it impossible to select a suitable sperm for fertilization by ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*). It is shown that 10.0% PVA solution can be used for immobilization of boar sperm, as it reduces motility by 46.7% ($P < 0.01$) of the initial sperm motility. It is proved that the motility in the case of incubation of deconserved ejaculated boar sperm in 5.0% PVA solution decreases only by 28.0% ($P < 0.05$) from the initial, which is optimal when using cryopreserved boar sperm, material which are limited and convenient for the operator and safe for oocytes.

Key words: ICSI, sperm motility, oocyte, polyvinylpyrrolidone, polyvinylalcohol, pig embryos