

Wybrane aspekty związane z zapłodnieniem *in vitro* u świń

DOROTA BUKOWSKA, BARTOSZ KEMPISTY^{*,***}, PIOTR ZAWIERUCHA^{*,***},
HANNA PIOTROWSKA^{**}, PAWEŁ ANTOSIK, MARTA JACKOWSKA,
JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, ARTUR BRYJA^{*}, MICHAŁ NOWICKI^{*}

Katedra Weterynarii Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UP w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 52, 61-625 Poznań

^{*}Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM, ul. Świąteczkiego 6, 60-781 Poznań

^{**}Katedra i Zakład Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UM, ul. Dojazd 30, 60-631 Poznań

^{***}Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Wydziału Lekarskiego II UM, ul. Świąteczkiego 6, 60-781 Poznań

Bukowska D., Kempisty B., Zawierucha P., Piotrowska H., Antosik P.,
Jackowska M., Jaśkowski J. M., Bryja A., Nowicki M.

Selected aspects of *in vitro* fertilization in pigs

Summary

In the past few years increased progress in the *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of porcine oocytes has occurred. The recovery of oocytes with full developmental competence was possible in the case of improved *in vitro* culture (IVC) methods. However, there is still a large problem with polyspermic embryos produced by IVF. The construction of culture media supplemented with hormones, amino acids and enzymes belongs to the most important factor in the decreasing of the polyspermy rate. These combinations lead to the decreased polyspermy rate and increased efficiency of fertilizations. The microsurgical injection of single spermatozoon into oocytes (ICSI) belongs to one of the most frequently used techniques. This method omits the natural selection of spermatozoa but may lead to the induction of several developmental defects in offspring. In this review the experimental results associated with *in vitro* techniques used in porcine reproductive biology have been presented.

Keywords: fertilization, ICSI, fusion proteins, pigs

Świnia, której udomowienie przypada na okres między VII a VI tysiącleciem p.n.e., jest dla człowieka nieocenionym źródłem mięsa czy tłuszczu. Ponadto zwierzę to charakteryzuje zaskakujące podobieństwo fizjologiczne do człowieka. Stwierdzenie to stało się przyczyną wykorzystania tego gatunku w badaniach biomedycznych zwłaszcza w zakresie ksenotransplantacji (31). Rozwój badań z wykorzystaniem świń pociągnął za sobą konieczność usprawnienia hodowli oraz pozyskiwania oocytów, jak i zarodków świń w warunkach *in vitro*. Technologie klonowania, jak również pozyskiwania transgenicznych świń wymagają w pełni dojrzałych oocytów oraz zarodków charakteryzujących się wysokim potencjałem rozwojowym. Metody stosowane dotychczas, polegające między innymi na chirurgicznym pobieraniu oocytów i zarodków pochłaniały zbyt dużo czasu, były drogie, a w rezultacie ilość pozyskanych komórek była ograniczona. Alternatywą dla tego podejścia stało się wykorzystanie hodowli *in vitro* oocytów połączonych z zapłodnieniem pozaustrojowym (31, 32), jednak sam proces zapłodnienia pozaustrojowego nie został dotychczas poznany. Uzasadniona wydaje się zatem

potrzeba badań mających na celu poznanie procesów regulujących rozwój zarodków pochodzących z oocytów pozyskiwanych metodami *in vitro* (IVF, IVP). Z drugiej strony, potrzeba ta może być także podyktowana chęcią obejścia problemów związanych z tradycyjnymi metodami reprodukcyjnymi. W warunkach *in vivo* poważnym problemem stały się infekcje wirusowe powodujące problemy z systemem oddechowym oraz wpływające na rozwój prosiąt. Przykładem wirusa dającego takie objawy jest wirus PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome) (17). Innym problemem dotyczącym rozrodu świń jest największy odsetek polispermii, co znacząco wpływa na efektywność rozrodu (23). Badania *in vitro* prowadzone w ciągu ostatnich lat skupiają się właśnie na blokowaniu procesu polispermii oraz wielu innych czynników negatywnie wpływających na rozród świń.

Dojrzewanie komórek w warunkach *in vitro* (IVM)

Zdolność oocytów do zapłodnienia uwarunkowana jest uzyskaniem przez te komórki pełnej dojrzałości jądrowej (molekularnej) oraz cytoplazmatycznej (1). Czynniki umożliwiającymi osiągnięcie dojrzałości

są różne typy pożywek wzbogacanych poprzez dodanie cielejcej surowicy płodowej (FCS), płynu pęcherzykowego (FF – follicular fluid) oraz innych suplementów w postaci hormonów gonadotropowych i czynników wzrostu (6, 8, 9, 22, 26). Stosowanie FCS oraz FF prowadzi do aktywacji wielu przemian metabolicznych w dojrzewających oocytach. W związku z tym pojawia się szereg trudności w precyzyjnym scharakteryzowaniu czynnika odpowiedzialnego za dojrzewanie tych komórek. Uważa się, że stosowanie pożywek pozbawionych surowicy pozwoli na ustalenie optymalnych warunków do wzrostu i dojrzewania oocytów *in vitro* (IVM) (26). Wielu spośród autorów stosuje dodatki do pożywek w postaci hormonów gonadotropowych, LH, FSH oraz czynników wzrostowych (6, 22). Mattioli i wsp. (27) wykazali, że inkubacja oocytów w obecności LH oraz FSH przyspiesza osiągnięcie przez oocyty stadium MII o, odpowiednio, 76% oraz 86%. Dodanie do tej pożywki nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF – epidermal growth factor) nie wpływało znacząco na uzyskanie dojrzałości jądrowej (3, 8, 9). Natomiast wzbogacenie pożywki gonadotropinami oraz EGF w znaczący sposób wpłynęło na formowanie męskiego przedjadrza (MPN). Sugeruje się więc, że oba te czynniki pozytywnie wpływają na uzyskanie przez oocyty pełnej dojrzałości zarówno jądrowej, jak i cytoplazmatycznej (6, 9, 20, 27).

Komórki wyselekcjonowane do dojrzewania w warunkach *in vitro* otoczone są przez warstwę komórek cumulusa tworzących kompleks (COC – cumulus oocyte complex). Uważa się, że kompleks tych komórek jest niezbędny dla uzyskania pełnej dojrzałości cytoplazmatycznej, wykształcenia męskiego przedjadrza oraz wzrost aktywności rozwojowej (2, 15, 19, 30). Komórki cumulusa podczas dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro* charakteryzują się różnym wzrostem (16). Sugeruje się, że rozmieszczenie i wzrost tych komórek może być wykorzystywany jako marker dojrzałości oocytów. Badania Funahashi i wsp. (10) wykazały, że synteza kwasu hialuronowego (HA – hyaluronic acid) w komórkach cumulusa jest skorelowana z jego wzrostem i stopniem rozmieszczenia. EGF działa stymulująco na uzyskanie dojrzałości jądrowej oocytów izolowanych tylko z dużych pęcherzyków (6-7 mm) (9). Ponadto wykazano, że ten sam czynnik indukuje zarówno syntezę HA w komórkach cumulusa, jak i jego zatrzymanie w macierzy pozakomórkowej (26). Podsumowując, obecność komórek wzgórka jajonośnego otaczających rozwijający się oocyt wpływa stymulująco na: osiągnięcie dojrzałości jądrowej (stadium MII), wewnątrzkomórkową zawartość glutationu (GSH), intensywność penetracji przez plemniki, formowanie MPN oraz aktywność kinazy specyficznej dla histonu H1 (11, 33). Ponadto komórki cumulusa stabilizują rozmieszczenie i migracje ziaren korowych (CG – cortical granules) oraz ich częściową egzocytozę.

Zapłodnienie *in vitro* (IVF – *in vitro* fertilization)

Skuteczna penetracja dojrzewających w warunkach *in vitro* oocytów została osiągnięta poprzez stosowanie różnych typów mediów w obecności świeżego lub mrożonego nasienia (18). Z uwagi na szereg trudności w skutecznej krioprezerwacji plemników nadal podczas rutynowego stosowania IVF wykorzystuje się świeżo pobrane nasienie (36). Różnice osobnicze sprawiają, że nasienie pochodzące od różnych knurów różni się znacznie pod względem stopnia penetracji osłonki przejrzystej oraz częstości pojawiania się polispermii (12, 31). Sugeruje się jednak, że wykorzystanie do IVF bogatej w plemniki frakcji nasienia redukuje zmienności w zdolności plemników do zapłodnienia (12, 31). Uzyskanie plemników o bardzo dobrych parametrach wymaga zastosowania odpowiednich metod ich oczyszczania i frakcjonowania (7). Jedną z najskuteczniejszych metod, powszechnie stosowanych również u ludzi jest metoda wirowania w gradiencie gęstości Percollu (21, 35). Metoda ta pozwala na oddzielenie od siebie frakcji najbardziej ruchliwych plemników od warstwy zawierającej gamety o obniżonej ruchliwości oraz zmienionej morfologii. Metoda ta pozwala również na oddzielenie ruchliwych plemników od okrągłych spermatyd oraz komórek somatycznych (21, 35). Stosuje się ją podczas badań molekularnych, gdzie istotną rzeczą jest pozbycie się ewentualnej kontaminacji ze strony innych komórek niż dojrzałe plemniki.

Klasyczne zapłodnienie *in vitro* polega na zawieszeniu frakcji plemników w kropli pożywki, w której umieszczone są oocyty w pełni dojrzałe oraz pozbawione komórek cumulusa. Stosowanie tej metody spotyka się jednak z wieloma trudnościami, do których należą: nieprawidłowości w formowaniu męskiego przedjadrza oraz polispermia (31, 32). Dodanie do pożywki, w której dojrzewają oocyty płynu pęcherzykowego (follicular fluid), pęcherzykowych komórek somatycznych, gonadotropin, EGF bądź cysteiny wpływają pozytywnie na osiągnięcie przez oocyt dojrzałości cytoplazmatycznej oraz tworzenie MPN (1, 28, 34). Udowodniono również, że formowanie MPN w obecności cysteiny jest skorelowane z podwyższonym stężeniem wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH) (33). Podobne efekty uzyskiwano również po przeprowadzeniu hodowli oocytów w obecności pęcherzykowych komórek somatycznych (9, 24). Synteza GSH w komórce jajowej jest niezbędna dla de-kondensacji chromatyny plemnika i formowania MPN (11, 33). Wykazano, że proces przekształcenia jądra komórkowego penetrujących plemników do męskiego przedjadrza najwydajniej przebiega w oocytach hodowanych oraz zapłodnionych w obecności komórek cumulusa (CC – cumulus complex) (2). Obecność tych komórek podczas dojrzewania oocytów warunkuje syntezę oraz utrzymanie odpowiednio wysokiego stężenia GSH (32). Jednym ze szlaków, na drodze którego odbywa się transport cząsteczek z komórek

CC do wnętrza oocytu, są połączenia typu *gap junction* (GJC – *gap junction connections*) (4, 5, 29). Badania Mori i wsp. pokazały, że mechanizm przekazywania sygnałów poprzez GJC odgrywa istotną rolę w szlaku transportowym pomiędzy komórkami CC a oocytem oraz jest skorelowany z formowaniem MPN (28, 29). Przedstawione wyniki badań potwierdzają ważną rolę komórek CC w uzyskaniu przez oocyt pełnej dojrzałości cytoplazmatycznej.

Większość pożywek stosowanych do zapłodnienia *in vitro* u świń jest wzbogaconych kafeiną oraz inhibitorem fosfodiesterazy. Fosfodiesteraza (PDE) jest enzymem katalizującym reakcje hydrolizy cyklicznych nukleotydów, takich jak cAMP i cGMP do odpowiednich nukleozydowych 5' monofosforanów. cAMP jest jednym z najważniejszych czynników warunkujących takie procesy, jak: ruchliwość plemników, capacitacja oraz uruchomienie szlaków sygnalizacyjnych warunkujących właściwy przebieg adhezji oraz fuzji gamet. Dodanie do pożywki, w której dochodzi do zapłodnienia, inhibitora PDE powoduje wzrost stężenia cAMP. Badania Funahashi i wsp. (12) wykazały, że wzbogacenie pożywki kafeiną zwiększa liczbę penetracji komórki jajowej do 98%. Stosując dodatki w postaci adenozyiny oraz białka indukującego zapłodnienie (FPP – fertilization-promoting peptide) nie uzyskiwano tak dobrych wyników (odpowiednio: 71% i 75%). Natomiast liczba polispermicznych oocytów wynosiła, odpowiednio: 25% przy dodaniu FPP, 21% adenozyiny oraz 87% przy zastosowaniu kafeiny (12). Sugeruje się więc, że FPP oraz adenozyina mogą wpływać na indukcję ścieżki sygnalizacyjnej cAMP poprzez regulację aktywności cyklazy adenylanowej (12). Funahashi i wsp. (12) sugerują, że niska liczba polispermicznych oocytów przy zastosowaniu FPP oraz adenozyiny może być wynikiem stymulacji capacitacji oraz zahamowania spontanicznej reakcji akrosomowej w plemnikach wykorzystanych do IVF. Tak więc zastąpienie kafeiny adenozyiną w znaczącym stopniu ogranicza częstość polispermicznych penetracji.

Istotną rolę w liczbie zarodków uzyskiwanych drogą zapłodnienia pozaustrojowego oraz liczbie polispermicznych zygot odgrywa skład chemiczny stosowanej pożywki. Marques i wsp. (26) porównywali dwa rodzaje pożywek mTBM (Tris-buffered medium) oraz zmodyfikowaną pożywkę Tyroda – mTALP (modified Tyrodes medium), a następnie analizowali współczynnik penetracji i liczbę zarodków polispermicznych przy koncentracji plemników 1×10^6 (26). Przy zastosowaniu mTBM liczba penetracji wynosiła od 92% do 94%, w porównaniu do pożywki mTALP od 61% do 77%, jednak podczas stosowania pożywki mTALP liczba zarodków polispermicznych wzrastała do 89%, w porównaniu do 50% przy zastosowaniu mTBM. Zwiększenie koncentracji plemników do 10×10^6 spowodowało zwiększenie współczynnika penetracji w przy-

padku obydwu pożywek, odpowiednio, 72% i 79%. Natomiast liczba polispermicznych zarodków była niższa po zastosowaniu mTBM 26% w porównaniu do 76% dla pożywki mTALP.

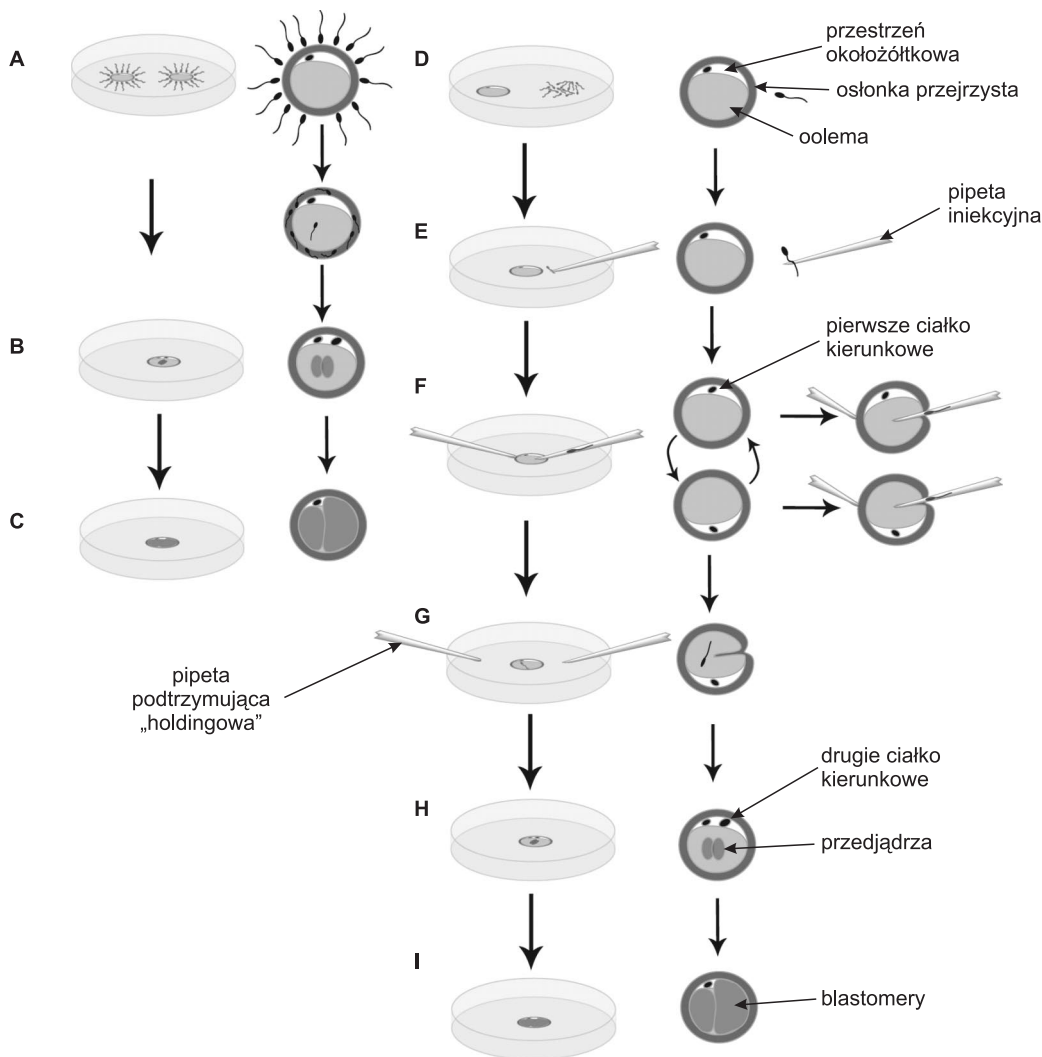
Docytoplazmatyczna iniekcja plemnika (ICSI – intracytoplasmic sperm injection)

Mikromanipulacja polega na bezpośrednim, mikrochirurgicznym wprowadzeniu plemnika do wnętrza komórki jajowej (ICSI). Przed przystąpieniem do ICSI oocyt musi być pozbawiony komórek wzgórka jajonośnego oraz wieńca promienistego. Następnie przeprowadza się dekonozację oocytów przy wykorzystaniu procesów enzymatycznych (zastosowanie hialuronidazy) i mechanicznych (przy pomocy pipetki o coraz mniejszej średnicy) (37). Umożliwia to ocenę dojrzałości i jakości oocytów. Tylko komórki jajowe w stadium metafazy II poddawane są mikromanipulacji. Oczyszczone oocyty MII umieszcza się pojedynczo w mikrokroplach podłoża hodowlanego na płycie Petriego, obok kropli z wcześniej odpowiednio przygotowanym nasieniem. Całość przykrywa się warstwą oleju mineralnego (13).

Wybrane plemniki o prawidłowej morfologii i ruchu postępowym unieruchamia się i wprowadza do wnętrza pipety iniekcyjnej. Unieruchomiona ujemnym ciśnieniem wytwarzanym w pipecie przytrzymującej komórka jajowa jest ustawiona ciałkiem kierunkowym prostopadle w stosunku do pipety podtrzymującej. Wprowadzenie plemnika do wnętrza oocytu w tej płaszczyźnie zmniejsza prawdopodobieństwo uszkodzenia wrzeczona kariokinetycznego. Wstrzyknięcie pojedynczego plemnika do cytoplazmy odbywa się po przerwaniu ciągłości osłonki przejrzystej, a następnie błony komórkowej oocytu.

ICSI jest metodą, która wymaga badania jakości genetycznej nasienia. Stosowanie tej techniki eliminuje proces naturalnej selekcji zachodzący podczas penetracji przez plemnik osłonki przejrzystej (*zona pellucida*) oocytu, który ma miejsce podczas naturalnego zapłodnienia, jak również podczas zapłodnienia *in vitro* przy zastosowaniu konwencjonalnej metody zapłodnienia pozaustrojowego IVF. Fakt ten budzi szereg kontrowersji ze względu na możliwość udziału w zapłodnieniu plemników zawierających uszkodzony materiał genetyczny (14, 35). Może to skutkować pojawieniem się u potomstwa nieprawidłowości chromosomowych, wad rozwojowych i chorób dziedzicznych.

Podczas stosowania ICSI następuje wstrzyknięcie plemnika do ooplazmy komórki jajowej przy zachowaniu akrosomu oraz błony komórkowej. Natomiast przy naturalnym zapłodnieniu większość z organeli komórkowych gamety męskiej jest eliminowanych w zapłodnionym oocycie. Kwon i wsp. (25) badali wpływ obecności akrosomu w plemnikach wykorzystanych do zapłodnienia pozaustrojowego przy zasto-



Ryc. 1. Proces zapłodnienia pozaustrojowego (IVF) polega na umieszczeniu na płytce kropli medium, w której zawieszono są oocyty oraz plemniki (A). W wyniku penetracji, adhezji oraz fuzji gamet jeden z plemników dostaje się do wnętrza oocytu. Etap ten kończy się formowaniem przedjądrzy oraz wyrzuceniem drugiego ciała kierunkowego (B). Efektem zapłodnienia jest 2-blastomerowy zarodek (C). Zapłodnienie pozaustrojowe ICSI polega na umieszczeniu plemników oraz oocytu w oddzielnych kroplach medium (D). Po unieruchomieniu (immobilizacji) plemnika wprowadza się go za pomocą pipety iniekcyjnej do wnętrza oocytu pod kątem 90° w stosunku do pierwszego ciała kierunkowego (E i F). Po wyrzuceniu drugiego ciała kierunkowego (H) formuje się 2-blastomerowy zarodek (I)

sowaniu metody ICSI. Wyniki tych badań pokazały, że wstrzyknięcie do oocytu myszy plemnika pochodzącego od królika z nienaruszonym akrosomem prowadziło do degeneracji ooplazmy. Natomiast wstrzyknięcie plemnika pozbawionego błony komórkowej oraz akrosomu skutkowało wykształceniem dwóch prawidłowych przedjądrzy. Sugeruje się, że istnieje gatunkowo-specyficzny mechanizm regulujący zakres tolerancji ooplazmy w stosunku do enzymów zawartych w akrosomie.

Zapłodnienie *in vitro* – problemy i perspektywy

Pomimo znacznego postępu w liczbie zarodków pozyskiwanych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego (IVP – *in vitro* production), nadal ich jakość oraz potencjał rozwojowy są niższe w porównaniu do

zarodków powstałych w wyniku zapłodnienia *in vivo*. Do najczęstszych problemów związanych z zapłodnieniem *in vitro* należą: nieprawidłowości w procesie formowania męskiego przedjądrza (MPN-poor male pronuclear formation), polispermia, niski potencjał rozwojowy zarodków oraz optymalizacja warunków hodowli zarodków (EC – embryo culture) (24, 31, 32). Postęp w doskonaleniu warunków dojrzewania oocytów (IVM – *in vitro* maturation), zarówno jądrowego, jak i cytoplazmatycznego doprowadził do zminimalizowania nieprawidłowości w formowaniu męskiego przedjądrza. Natomiast polispermia nadal stanowi istotną przeszkodę w uzyskiwaniu zarodków drogą *in vitro* (IVP). Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za właściwy przebieg procesów dojrzewania oocytów oraz hodowli zarodków *in vitro* stanowić będzie istotny element zarówno w zwiększaniu wydajności hodowli świń, jak i wykorzystaniu coraz większej liczby tych zwierząt w badaniach biomedycznych.

Piśmiennictwo

1. Abeydeera L. R.: In vitro fertilization and embryo development in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 2001, 58, 159-173.
2. Abeydeera L. R., Wang W. H., Cantley T. C., Rieke A., Day B. N.: Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.* 1998, 58, 213-218.
3. Antosik P., Kempisty B., Bukowska D., Jackowska M., Włodarczyk R., Budna J., Brüßow K. P., Lianeri M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M.: Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of pubertal gilts. *J. Reprod. Dev.* 2009, 55, 588-593.
4. Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Woźna M., Lianeri M., Brüßow K. P., Jaśkowski J. M.: Assessment of transcripts and protein contents contributing to cell cycle control and gap junction connections in morphologically variable groups of porcine cumulus-oocyte complexes. *Vet. Med.* 2010, 55, 512-521.

5. Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Piotrowska H., Woźna M., Bukowska D., Bryja A., Lianeri M., Brüssow K. P., Jaśkowski J. M.: Are the levels of Cdk4 and Cx43 proteins of porcine oocytes associated with follicular size? *Anim. Biol.* 2011, 61, 211-224.
6. Bukowska D., Kempisty B., Piotrowska H., Zawierucha P., Jaśkowski J. M., Nowicki M.: The in vitro culture supplements and selected modification during canine oocytes maturation. *PJSV*, 2012, w druku.
7. Bukowska D., Kempisty B., Sikora J., Jackowska M., Woźna M., Antosik P., Piotrowska H., Budna J., Jaśkowski J. M.: The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. *Vet. Med.* 2011, 56, 248-254.
8. Coskun S., Lin Y. C.: Effect of transforming growth factor and activin-A on in vitro porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 1994, 38, 153-159.
9. Ding J., Foxcroft G. R.: Epidermal growth factor enhance oocyte maturation in pig. *Mol. Reprod. Dev.* 1994, 39, 30-40.
10. Funahashi H., Asano A., Fujiwara T., Nagai T., Niwa K., Fraser L. R.: Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 55, 117-124.
11. Funahashi H., Day B. N.: Effect of cumulus cells on glutathione content of porcine oocytes during in vitro maturation. *J Anim. Sci.* 1995, 73 (Suppl 1).
12. Funahashi H., Fujiwara T., Nagai T.: Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine fertilization promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 2000, 63, 1157-1163.
13. Garcia-Rosello E., Matas C., Canovas S., Moreira P. N., Gadea J., Coy P.: Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J Androl.* 2006, 27, 268-275.
14. Górska I., Kempisty B., Jagodziński P. P.: Epigenetic modifications in the germline cells. *Ginek. Prakt.* 2006, 3, 2-5.
15. Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosińska E., Woźna M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M.: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 79-85.
16. Jackowska M., Kempisty B., Woźna M., Piotrowska H., Antosik P., Zawierucha P., Bukowska D., Nowicki M., Jaśkowski J. M., Brüssow K. P.: Differential expression of GDF9, TGFB1, TGFB2 and TGFB3 in porcine oocytes isolated from follicles of different size before and after culture in vitro. *Acta Vet. Hung.* 2012, w druku.
17. Jeong H. J., Song Y. J., Lee S. W., Lee J. B., Park S. Y., Song C. S., Ha G. W., Oh J. S., Oh Y. K., Choi I. S.: Comparative measurement of cell-mediated immune responses of swine to the M and N proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17, 503-512.
18. Kamiya C., Kobayashi M., Fukui Y.: In vitro culture conditions using chemically defined media for in vitro matured and intracytoplasmically inseminated porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 2006, 52, 625-632.
19. Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.: Assessment of zona pellucida glycoprotein and integrin transcript contents in porcine oocytes. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 71-78.
20. Kempisty B., Bukowska D., Piotrowska H., Zawierucha P., Śniadek P., Walczak R., Dziuban J., Antosik P., Jaśkowski J. M., Brüssow K. P., Nowicki M., Zabel M.: Selected molecular and microfluidic aspects of mammalian oocyte maturation-perspectives: a review. *Vet. Med. (Praha)* 2011, 8, 367-378.
21. Kempisty B., Jędrzejczak P., Jagodziński P. P.: Structure and role of protamines 1 and 2 in spermatogenesis and male infertility. *Ginek. Pol.* 2006, 77, 238-245.
22. Kempisty B., Woźna M., Piotrowska H., Bukowska D., Jackowska M., Antosik P., Jaśkowski J. M., Brüssow K. P.: The expression of genes encoding zona pellucida glycoproteins in canine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in media supplemented with progesterone and estradiol. *Theriogenology* 2012, 77, 684-693.
23. Kezuki H., Saito Y., Kagawa N., Yang X.: In vitro fertilization and polyspermy in the pig: factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. *Microsc. Res. Tech.* 2003, 61, 327-334.
24. Koo D. B., Kim Y. J., Yu I., Kim H. N., Lee K. K., Han Y. M.: Effects of in vitro fertilization conditions on preimplantation development and quality of pig embryos. *Theriogenology* 2003, 59, 95-106.
25. Kwon I. K., Park K. E., Niwa K.: Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2004, 71, 1430-1436.
26. Marques M. G., Nicacio A. C., de Oliveira V. P., Nascimento A. B., Caetano H. V., Mendes C. M., Mello M. R., Milazzotto M. P., Assumpcao M. E., Visintin J. A.: In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 97, 375-381.
27. Mattioli M., Bacci M. L., Galeati G., Seren E.: Effect of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 1991, 36, 95-105.
28. Mattioli M., Galeati G., Seren E.: Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.* 1988, 20, 177-183.
29. Mori T., Amano T., Shimizu H.: Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biol. Reprod.* 2000, 62, 913-919.
30. Nagashima H., Fujimura T., Takahagi Y., Kurome M., Wako N., Ochiai T., Esaki R., Kano K., Saito S., Okabe M., Murakami H.: Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 90, 101-110.
31. Niemann H., Rath D., Wrenzycki G.: Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reprod. Domest. Anim.* 2003, 38, 82-89.
32. Niemann H., Rath D., Wrenzycki C., Niwa K.: Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 48, 49-59.
33. Perreault S. D., Barbee R. R., Slott V. I.: Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 1988, 125, 181-186.
34. Prochazka R., Srsen V., Nagyova E., Miyano T., Flechon J. E.: Developmental regulation of effect of epiderma growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 56, 63-73.
35. Sikora J., Kempisty B., Jędrzejczak P., Jagodziński P. P.: Influence of DNA damage on fertilizing capacity of spermatozoa. *Przegl. Lek.* 2006, 63, 800-802.
36. Suzuki C., Yoshioka K., Itoh S., Kawarasaki T., Kikuchi K.: In vitro fertilization and subsequent development of porcine oocytes using cryopreserved and liquid-stored spermatozoa from various boars. *Theriogenology* 2005, 64, 1287-1296.
37. Yong H. Y., Pyo B. S., Hong J. Y., Kang S. K., Lee B. C., Lee E. S., Hwang W. S.: A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3-4 micro m diameter injection pipette. *Hum. Reprod.* 2003, 11, 2390-2396.

Adres autora: dr Bartosz Kempisty, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań;
e-mail: etok@op.pl