

УДК 636.4.082.453.5:57.085.2:57.089.3
DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.60.15>

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ICSI ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ *IN VITRO*

О. В. ЩЕРБАК, О. Ю. ЛИЗОГУБ

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

<https://orcid.org/0000-0001-6400-8990> – О. В. Щербак

<https://orcid.org/0000-0001-6834-3358> – О. Ю. Лизогуб

oksanalyzohub@gmail.com

*У статті наведено аналіз літературних джерел щодо використання методу ICSI (intracytoplasmic sperm injection – інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда в ооцит) для отримання ембріонів тварин *in vitro*. Метод ICSI забезпечує ефективне запліднення із залученням мінімальної кількості сперматозоїдів, що вкрай важливо під час роботи із генетичним матеріалом тварин, який зберігається тільки в кріобанках в обмеженій кількості або тваринами, які перебувають на межі зникнення. Проведено порівняльний аналіз використання методу ICSI за різних його модифікацій на можливість застосування таких підходів для одержання ембріонів в умовах *in vitro*. Встановлено, що для раціонального використання племінних (генетичних) ресурсів у свинарстві необхідно розробляти та удосконалювати біотехнологічні методи відтворення з метою подальшого впровадження їх в практику.*

Ключові слова: свині, ICSI, запліднення, біорізноманіття, кріоконсервація

PROSPECTS OF APPLICATION OF ARTIFICIAL FERTILIZATION FOR OBTAINING PIG EMBRYOS *IN VITRO*

O. V. Shcherbak, O. Yu. Lyzohub

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

In the article the likely solution to the urgent problem of preserving breeds of animals that are on the verge of extinction or have disappeared forever, but their genetic material is cryopreserved, using the method of intracytoplasmic injection of sperm into the oocyte (ICSI) was discussed. This method allows increasing the efficiency of fertilization with the involvement of fewer gametes, which is extremely advantageous in working with extinct species and species that are on the verge of extinction. Our data on the application of the ICSI method with various modifications allow us to say that this method is quite promising for implementation it in practice.

Keywords: pig, ICSI, fertilisation, biodiversity, cryopreservation

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИСКУССТВЕННОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭМБРИОНОВ СВИНЕЙ *IN VITRO*

О. В. Щербак, О. Ю. Лизогуб

Інститут розведення і генетики животнох імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

*В статті проведено аналіз літературних даних по використанню методу ICSI (intracytoplasmic sperm injection – інтрацитоплазматическая ін'єкція сперматозоїда в ооцит) для отримання ембріонів животнох *in vitro*. Метод ICSI забезпечує ефективне*

оплодотворение с использованием минимального количества сперматозоидов, что крайне важно при работе с генетическим материалом животных, который хранится только в криобанках в ограниченном количестве или животными, находящимися на грани исчезновения. Проведен сравнительный анализ использования метода ICSI при различных его модификациях и возможность применения таких подходов для получения эмбрионов в условиях *in vitro*. Установлено, что для рационального использования племенных (генетических) ресурсов в свиноводстве необходимо разрабатывать и совершенствовать биотехнологические методы воспроизводства с целью дальнейшего внедрения их в практику.

Ключевые слова: свиньи, ICSI, оплодотворение, биоразнообразие, криоконсервация

В статье приведены литературные данные по использованию метода искусственного оплодотворения для получения эмбрионов свиней *in vitro* (интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ICSI – Intracytoplasmic sperm injection)) с целью установления возможности применения таких подходов для сохранения и улучшения генофонда отечественных пород свиней. Метод ICSI обеспечивает эффективное оплодотворение с использованием минимального количества сперматозоидов, что очень удобно в работе с исчезающими видами и видами, которые находятся на грани исчезновения. Представленные нами данные по применению метода ICSI с различными модификациями указывают на перспективность применения метода ICSI для внедрения его в практику.

Ключевые слова: свиньи, ICSI, оплодотворение, биоразнообразие, криоконсервация

Вступ. Згідно з даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) щодо видового різноманіття одомашнених тварин з початку минулого століття в Європі серед локальних порід сільськогосподарських тварин зникли майже 11%, а під загрозою зникнення знаходиться понад 40% [13].

Якщо розглядати ситуацію щодо зникнення порід свиней, то наразі вона не є оптимістичною. Станом на 2019 рік серед регіональних порід свиней в Європі та Кавказі зниклими вважаються 21% порід, в небезпеці 32%, і лише 7% з них – не в зоні ризику (рис. 1). В Україні на межі зникнення перебувають одночасно кілька порід свиней: українська степова ряба, мангалиця, українська степова біла та локальна дніпропетровська популяція української м'ясної. Такі дані в цілому та в Україні, зокрема свідчать про недостатні зусилля, які залучені до збереження генофонду або ж неефективність методів, які застосовуються наразі [13, 20].

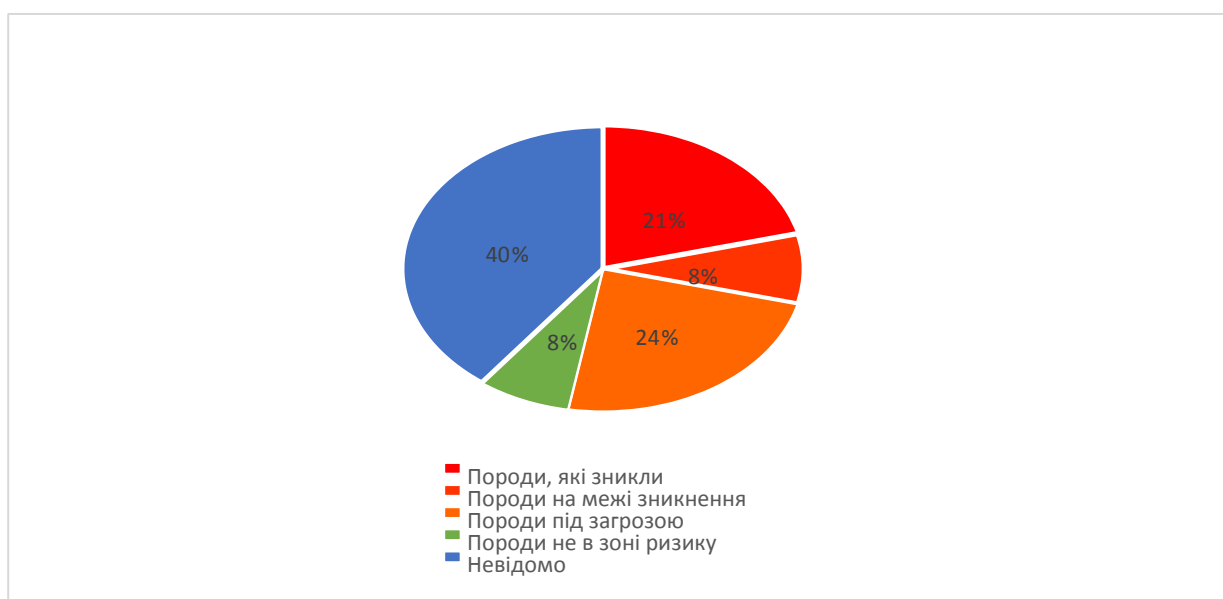


Рис. 1. Стан порід свиней в Європі та Кавказі у 2019 році

До того ж пандемія коронавірусу Covid-19, яка розпочалася в 2019 році та продовжується досі, показала, що країни не готові до боротьби з новими вірусами, які можуть вражати як тварин, так і людей. Підтвердженням цьому є і зникнення в 2018 році двох вітчизняних порід свиней: миргородської та великої чорної, внаслідок спалаху африканської чуми свиней. Тому зберігання автохтонних порід, у вигляді невеликих популяцій є вкрай ризикованим способом збереження різноманіття. Такі підходи є також ризикованими і через те, що в невеликих популяціях явище інбридингу може спричиняти дрейф генів і, як наслідок, може призводити до накопичення небажаних мутацій [1, 13, 15, 18].

Рішенням цієї проблеми може стати кріоконсервація генетичного матеріалу у вигляді сперми, ооцитів та ембріонів сільськогосподарських тварин та зберігання його у кріосховищах упродовж необмеженого часу [5, 15, 16]. Зважаючи на те, що після кріоконсервації виживає невеликий відсоток ооцитів і сперматозоїдів ми маємо обмежену кількість вихідного матеріалу і тому існує нагальна потреба максимально оптимізувати процес отримання ембріонів для раціонального використання цінного генетичного матеріалу. Побічною проблемою є те, що активність кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів не завжди забезпечують високу частоту запліднення та формування якісних ембріонів на доімплантаційних стадіях у разі застосуванні методу запліднення *in vitro*. Однією з найголовніших проблем даного методу також є і неможливість контролювати явище поліспермії під час запліднення ооцита та низьку здатність до розвитку отриманих зигот. Це призводить до того, що у разі недосконалого методу дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів запліднення буде низьким і встановити причину даного явища буде вкрай важко [2, 18].

Однак, у свинарстві є загроза зникнення порід через періодичні спалахи інфекційних захворювань. Науковці постійно приділяють увагу питанням збереження генофонду цього виду тварин, але підходи до кріоконсервації гамет та ембріонів все ще не забезпечують стабільних та високих результатів. Деякі біотехнологічні маніпуляції мали лише інформативний характер [20] хоча для практичних підходів до збереження генофонду вкрай необхідні.

Метод ICSI – це запліднення ооцитів *in vitro* під час якого відбувається ін'єкція одного сперматозоїда в зрілий ооцит на стадії метафази II мейозу. ICSI включає іммобілізацію сперматозоїда шляхом пошкодження хвоста, аспірацію цитоплазми ооцита ін'єкційною піпеткою та випускання одного сперматозоїда в цитоплазму. Порушення цитоплазми ооцита та сперматозоїда є важливим етапом для успішного запліднення, оскільки пошкодження ооцита це необхідний крок для злиття двох гамет, а пошкодження хвоста сперматозоїда важливе для вивільнення розчинних факторів сперми, які мають індукувати активацію ооцитів. Наразі він добре відпрацьований на ооцитах жінок, але для ооцитів інших видів ссавців залишається недостатньо оптимізованим для досягнення відповідного рівня запліднення та формування ембріонів. Наразі в нашій країні дуже мало даних щодо застосування методу ICSI для *in vitro* запліднення тварин, в тому числі свиней, хоча цей метод підвищить ефективність запліднення та формування повноцінних ембріонів.

Матеріали та методи дослідження. Для реалізації поставленої мети проведено патентний пошук щодо ефективного застосування методу ICSI для отримання ембріонів *in vitro* та застосовано методи опису, порівняння та синтезу.

Результати досліджень. Проведення ICSI забезпечує вирішенням складного питання поліспермії під час запліднення *in vitro* [9]. Цей метод забезпечує використання мінімальної кількості вихідного матеріалу для отримання максимальної кількості ембріонів та надає можливість застосування в тому числі і сперматозоїдів з недостатньою рухливістю. Оскільки цей метод для одержання ембріонів свиней *in vitro* є багатоступеневим: необхідно отримати дозрілі *in vitro* ооцити, освоїти процедуру відбору сперматозоїда в ін'єкційну піпетку, проведення процедури ICSI та культивування ембріонів, нами відпрацьовано всі етапи, хоча етап культивування ембріонів після ICSI потребує удосконалення. Так ооцити свиней, які нами культивовані *in vitro* до стадії метафази II мейозу і мали ідентифіковане перше полярне тіло були успішно ін'єктовані з внесенням одного сперматозоїда в цитоплазму ооцита (рис. 2).

Незважаючи на переваги методу ICSI та перспективність його застосування для підвищення ефективності запліднення існує ряд проблем з використанням його для гамет тварин, порівняно з гаметами людини. Насамперед, під час запліднення ооцитів великої рогатої худоби та свиней, спостерігається значно менша кількість отриманих ембріонів. На думку науковців на це можуть впливати декілька факторів, серед яких використанням ін'єкційної піпетки меншого діаметру для сперматозоїдів людини (вони менші за сперматозоїди тварин і відбувається менша травматизація ооцита), відсутністю процедури центрифугування ооцитів перед ICSI, яке потрібно для деяких видів тварин та коротшим джгутиком сперматозоїда, що забезпечує потрапляння меншої кількості чужорідної рідини в цитоплазму [9, 14].

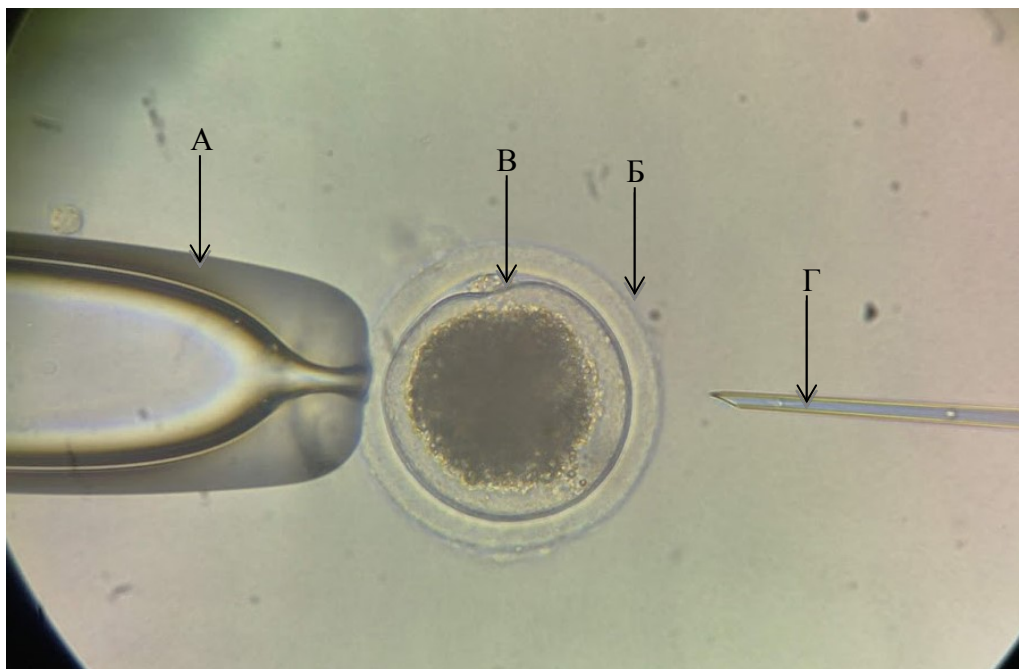


Рис. 2. Запліднення *in vitro* ооциту свині методом ICSI.

А – утримуюча піпетка; Б – ооцит свині; В – полярне тільце; Г – сперматозоїд. Об. 10х, ок. 40х

Дослідження із запліднення *in vitro* на розморожених незрілих ооцитах свиней, які перебували на стадії зародкового пухирця показали низький рівень формування бластоцист – 5,2% [2]. Встановлено, що вітрифіковані ооцити, заплідненні *in vitro* мали вищий рівень формування бластоцист, ніж ооцити тієї ж групи запліднені методом ICSI. Автори це явище пояснюють недостатністю фізіологічної складової в процесі ICSI. Сперматозоїди можуть пропускати необхідні етапи природнього запліднення, такі як впізнавання ооцита і сперматозоїда та акросомальна реакція [4, 7, 8, 10].

Також проведення ICSI потребує використання розчину полівінілпіролідону для сповільнення швидкості руху сперматозоїдів. Ця молекула може бути шкідливою під час введення її в ооцит і негативно впливати на запліднення та деконденсацію ДНК сперматозоїдів. Нами відпрацьовано процедуру відбору сперматозоїда кнура в ін'єкційну піпетку після сповільнення його руху в розчині полівінілпіролідону (рис. 3).

На противагу цьому, інші дослідження показали, що нижча ефективність застосування ICSI, порівняно із запліднення *in vitro* пов'язана з неправильним вибором сперми для запліднення [11]. Для збільшення кількості отриманих зигот при заплідненні *in vitro* з використанням методу ICSI науковці використовують різні методики, що дозволяють підвищувати результативність даного методу [2, 6, 14].

В 2018 році було доведено, що суттєво покращується результативність проведення запліднення модифікованим методом ICSI у разі використання гіалуронової кислоти для вибору сперматозоїдів під назвою PICSI [2]. Також встановлено, що тільки зрілі сперматозоїди мають

рецептор до гіалуронової кислоти, яка міститься на прозорій оболонці ооцита, тому для запліднення відбираються тільки зрілі сперматозоїди.

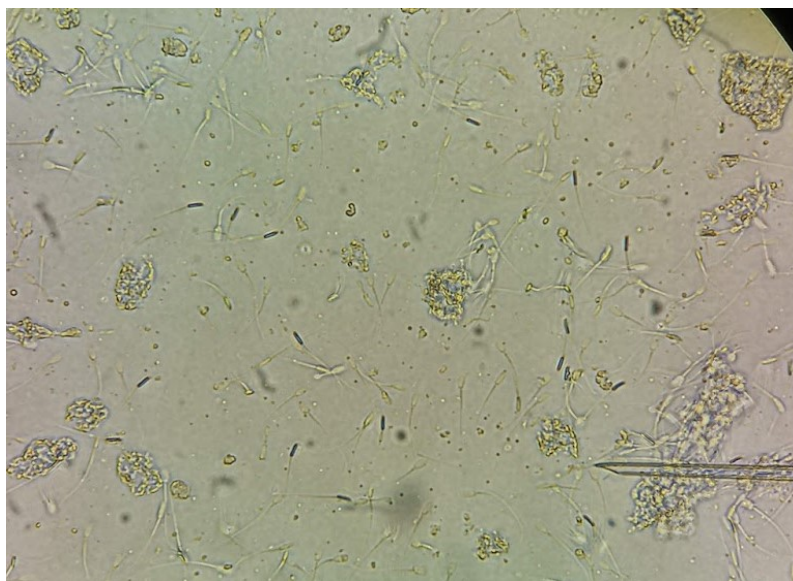


Рис. 3. Сперматозоїди кнура в розчині полівінілпіролідону та ін'єкційна піпетка. Об. 10х, ок. 40х

Іншим модифікованим методом ICSI є метод пошкодження головки. Під час природного процесу запліднення цитоплазма з'єднується з постакросомальною ділянкою плазматичної мембрани головки сперми. Тому для кращої результативності запліднення запропоновано пошкоджувати не джгутик, а головку сперматозоїда. Більшість існуючих методик запліднення ICSI поєднують у собі різноманітні техніки пошкодження хвоста сперматозоїда, але в 2003 році було проведено дослідження згідно з яким відбувалося пошкодження головки сперматозоїда перед поміщенням його в ооцит. Крім того, в дослідженні Yong H. Y. et al. було використано полівінілалкоголь, замість полівінілпіролідону. Припускають, що уникнення шкідливого ефекту від полівінілпіролідону покращить розвиток запліднених ооцитів. До того ж, у разі використання полівінілалкоголю мінеральна олія в процесі проведення процедури менше налипає на піпетку, так само як і клітинні рештки. Це значно покращує процес засмоктування цитоплазми та випускання сперматозоїда, і є більш безпечно, що в свою чергу знижує кількість дегенерованих ооцитів. У разі застосування такого методу утворення бластоцист підвищувалось на 6%, порівняно з контрольною групою, де ооцити були запліднені традиційним методом ICSI [14].

Тривалий час існувала думка, що пошкодження головки сперматозоїда призводить до пошкодження генетичного матеріалу, це в свою чергу призводить до відсутності запліднення чи формування аномальних ембріонів. Тому серед вимог до проведення ICSI основним було перебивання хвостика та уникнення ділянки головки та шийки сперматозоїда. Але Yong H. Y. et al. довели, що дисульфідні мости головки сперматозоїда, які формуються проходячи через епідидиміс роблять ядро сперматозоїда стійким до хімічних та фізичних розривів [14].

Deng T. et al. в 2020 році оприлюднили результати досліджень щодо обробки ооцитів під час процедури ICSI урходезоксихолевою кислотою та довели, що такий підхід збільшує кількість отриманих зигот. Цей феномен вони пояснюють здатністю даної речовини зменшувати оксидативний стрес, який спричиняється під час цієї процедури в ендоплазматичному ретикулумі та попереджувати процеси апоптозу [6].

Незважаючи на всі вищеназвані проблеми згідно з опублікованими даними Американської асоціації трансплантації ембріонів, за 2018 рік в Сполучених штатах Америки із усіх трансплантованих ембріонів різних видів тварин 40% були заплідненими методом ICSI [12]. З цього можемо зробити висновок, що хоча проблема запліднення методом ICSI залишається невирішеною, цей метод є достатньо перспективним біотехнологічним

методом для застосування його у тваринництві. Зважаючи, на швидке зникнення порід свиней даний метод буде доцільним для опанування та застосування його для відтворення генофонду цінних порід свиней.

Висновки. З огляду на несприятливі соціально-економічні зміни, які викликані пандемією та іншими інфекційними хворобами надійними підходами до ефективного вирішення завдань збереження та відтворення генофонду сільськогосподарських тварин є широке впровадженням в практику сучасних біотехнологічних методів. Під час розробки програм збереження генофонду необхідно врахувати закономірності генетичних процесів в обмежених популяціях, орієнтуватися на широке використання таких біотехнологічних методів, як заморожування епідидимальних сперматозоїдів плідників; кріоконсервація ооцитів і отримання ембріонів *in vitro*, різними методами в тому числі і методом ICSI в разі обмеженої кількості генетичного матеріалу. Удосконалення біотехнологічних методів для кожного виду сільськогосподарських тварин збільшить кількість запліднених клітин та покращить якість сформованих ембріонів на доімплантаційних стадіях розвитку, що є ключовим для подальшого використання генетичного матеріалу в програмах збереження генофонду сільськогосподарських тварин.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Bowley S. C., Comizzoli P., Lindell K. A., Matsas D. Genetic Cryopreservation of Rare Breeds of Domesticated North American Livestock: Smithsonian & SVF Biodiversity Preservation Project. *Diversity*. 2019. Vol. 11. P. 198. DOI: <https://doi.org/10.3390/d11100198>.

2. Casillas F., Betancourt M., Cuello C., Ducolomb Y., Lopez A., Juarez-Rojas L., Retana-Marquez S. An efficiency comparison of different *in vitro* fertilization methods: IVF, ICSI, and PICSI for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocyte. *Porcine Health Management*. 2018. Vol. 4. P. 22–29. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0093-6>.

3. Casillas F., Ducolomb Y., Lemus A. E., Cuello C., Betancourt M. Porcine embryo production following *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell coculture system. *Cryobiology*. 2015. Vol. 71. P. 299–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.003>.

4. Catt J. W., Rhodes S. L. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995. Vol. 7. P. 161–167. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD9950161>.

5. Chian R. C., Kuwayama M., Tan L., Tan J., Kato O., Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 2004. Vol. 50. P. 685–696. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.50.685>.

6. Deng T., Xie J., Hengtao G., Liu Q., Song X., Hu L., Meng L., Zhang C. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) enhanced intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryo developmental competence by ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and inhibiting apoptosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020. Vol 37. P. 119–126. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01627-2>.

7. Flaherty P., Payne D., Swann N. J., Matthews C. D. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm. *Human Reproduction*. 1995. Vol. 10. P. 2623–2629. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135757>.

8. García-Mengual E., García-Roselló E., Alfonso J., Salvador I., Cebrian-Serrano A., Silvestre M. A. Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with triton X-100 in pigs. *Theriogenology*. 2011. Vol. 79. P. 1658–1666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.030>.

9. Grad-Mandryk I., Kosenyuk J., Gajda B. Developmental competence of pig embryos after standard *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction, Fertility and Development*. Poland, 2012. Vol. 25. P. 260–261. DOI: <https://doi.org/10.1071/RDv25n1Ab225>

10. Hewitson L., Simerly C., Dominko T., Schatten G. Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2000. Vol. 53. P. 95–104. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00243-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00243-5).
11. Kato Y., Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reproductive Medicine and Biology*. 2012. Vol. 11. P. 165–176. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12522-012-0126-9>.
12. Statistics committee report – AETA 2019. 2019. URL: https://www.aeta.org/docs/2018_Stats.pdf (2018 data).
13. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS) / Food and Agriculture Organization of United States. URL: <http://www.fao.org/dad-is/trend-in-risk-status/en/>.
14. Yong H. Y., Pyo P. S., Hong G. Y., Kang K. S., 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 mm diameter injection pipette. *Human Reproduction*. 2003. Vol. 18 (11). P. 2390–2396. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/deg442>.
15. Галицька Т. В., Ковтун С. І., Троцький П. А. Застосування новітніх біотехнологічних методів для збереження генофонду свиней. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2012. Вип. 46. С. 48–50.
16. Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Ковтун С. І., Свергунов А. О., Свергунова Г. О. Аналіз ефективності розвитку поза організмом ембріонів свиней за допомогою використання наноматеріалу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2019. Вип. 25. С. 231–236. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1168>.
17. Ковтун С. І., Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Троцький П. А. Використання нанобіотехнологічних методів для оптимізації технології культивування ооцитів корів поза організмом. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2018. Вип. 22. С. 257–261. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.958>.
18. Кузьміна Т. И., Новичкова Д. А., Волкова Н. А. Моделирование систем созревания ооцитов свиней *in vitro*. *Сельскохозяйственная биология*. 2013. Вып. 2. С. 1–6.
19. Куновський Ю. В. Застосування трансплантації ембріонів у свинарстві. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2006. Вип. 40. С. 69–74.
20. Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017–2025 роки / Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. URL: http://iabg.org.ua/images/stories/prog_zber.pdf. DOI: 636.082:502(477).

REFERENCES

1. Bowley, S. C., P. Comizzoli, K. A. Lindell, and D. Matsas. 2019. Genetic Cryopreservation of Rare Breeds of Domesticated North American Livestock: Smithsonian & SVF Biodiversity Preservation Project. *Diversity*. 11:198. DOI: <https://doi.org/10.3390/d11100198> (in English).
2. Casillas, F., M. Betancourt, C. Cuello, Y. Ducolomb, A. Lopez, L. Juarez-Rojas, and S. Retana-Marquez. 2018. An efficiency comparison of different in vitro fertilization methods: IVF, ICSI, and PICSU for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocyte. *Porcine Health Management*. 4:22–29. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0093-6> (in English).
3. Casillas, F., Y. Ducolomb, A. E. Lemus, C. Cuello, and M. Betancourt. 2015. Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell coculture system. *Cryobiology*. 71:299–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.003> (in English).
4. Catt, J. W., and S. L. Rhodes. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reproduction, Fertility and Development*. 7:161–167. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD9950161> (in English).

5. Chian, R. C., M. Kuwayama, L. Tan, J. Tan, O. Kato, and T. Nagai. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 50:685–696. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.50.685> (in English).
6. Deng, T., J. Xie, G. Hengtao, Q. Liu, X. Song, L. Hu, L. Meng, and C. Zhang. 2020. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) enhanced intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryo developmental competence by ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and inhibiting apoptosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 37:119–126. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01627-2> (in English).
7. Flaherty, P., D. Payne, N. J. Swann, and C. D. Matthews. 1995. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm. *Human Reproduction*. 10:2623–2629. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135757> (in English).
8. García-Mengual, E., E. García-Roselló, J. Alfonso, I. Salvador, A. Cebrian-Serrano, and M. A. Silvestre. 2011. Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with triton X-100 in pigs. *Theriogenology*. 79:1658–1666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.030> (in English).
9. Grad-Mandryk, I., J. Kosenyuk, and B. Gajda. 2012. Developmental competence of pig embryos after standard in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction, Fertility and Development*. Poland, 25:260–261. DOI: <https://doi.org/10.1071/RDv25n1Ab225> (in English).
10. Hewitson, L., C. Simerly, T. Dominko, and G. Schatten. 2000. Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 53:95–104. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00243-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00243-5) (in English).
11. Kato, Y., and Y. Nagao. 2012. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reproductive Medicine and Biology*. 11:165–176. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12522-012-0126-9> (in English).
12. *Statistics committee report – AETA 2019 (2018 data)* [Electronic resource]. – 2019. – Resource access mode: https://www.aeta.org/docs/2018_Stats.pdf (in English).
13. *Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS)* [Electronic resource] // Food and Agriculture Organization of United States. Resource access mode: <http://www.fao.org/dad-is/trend-in-risk-status/en/> (in English).
14. Yong, H. Y., P. S. Pyo, G. Y. Hong, K. S. Kang, B. C. Lee, E. S. Lee, and W. S. Hwang. 2003. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3 ± 4 mm diameter injection pipette. *Human Reproduction*. 18(11):2390–2396. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/deg442> (in English).
15. Halyts'ka, T. V., S. I. Kovtun, and P. A. Trots'kyy. 2012. Zastosuvannya novitnikh biotekhnolohichnykh metodiv dlya zberezhennya henofondu svynei – Application of the latest biotechnological methods to preserve the gene pool of pigs. *Rozvedennya i henetyka tvaryn – Animal Breeding and Genetics*. Kyiv, 46:48–50 (in Ukrainian).
16. Zyuzyun, A. B., O. V. Shcherbak, S. I. Kovtun, A. O. Sverhunov, and H. O. Sverhunova. 2019. Analiz efektyvnosti rozvytku poza orhanizmom embrioniv svynei za dopomohoyu vykorystannya nanomaterialu – Analysis of the effectiveness of development outside the body of pig embryos through the use of nanomaterial. *Fakty eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv – Factors of experimental evolution of organisms*. Kyiv, 25:231–236. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1168> (in Ukrainian).
17. Kovtun, S. I., A. B. Zyuzyun, O. V. Shcherbak, and P. A. Trots'kyy. 2018. Vykorystannya nanobiotekhnolohichnykh metodiv dlya optymizatsiyi tekhnolohiyi kul'tyvuvannya ootsytiv koriv poza orhanizmom – The use of nanobiotechnological methods to optimize the technology of cultivation of cow oocytes outside the body. *Fakty eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv – Factors of experimental evolution of organisms*. Kyiv, 22:257–261. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.958> (in Ukrainian).

18. Kuz'mina, T. I., D. A. Novichkova, and N. A. Volkova. 2013. Modelirovanie sistem sozrevanija oocitov svinej *in vitro* – Modeling in vitro porcine oocyte maturation systems. *Sel's'kohozjajstvennaja biologija – Agricultural biology*. 2:1–6 (in Russian).

19. Kunovs'kyy, Yu. V. 2006. Zastosuvannya transplantatsiyi embrioniv u svynarstvi – Application of embryo transplantation in pig breeding. *Rozvedennya i henetyka tvaryn – Animal breeding and genetics*. 40:69–74 (in Ukrainian).

20. Prohrama zberezhennya henofondu lokal'nykh i znykayuchykh porid sil's'kohospodars'kykh tvaryn v Ukrayini na 2017–2025 roky – Program for conservation of the gene pool of local and endangered breeds of farm animals in Ukraine for 2017–2025. 2017. [Electronic resource]. *Instytut rozvedennya i henetyky tvaryn imeni M.V.Zubtsya NAAN – Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine*. Resource access mode: http://iabg.org.ua/images/stories/prog_zber.pdf. DOI: 636.082:502(477) (in Ukrainian).

Одержано редколегією 09.11.2020 р.

Прийнято до друку 16.11.2020 р.