

# Molekularne aspekty procesu dojrzewania jądrowego i cytoplazmatycznego oocytów u świń<sup>\*)</sup>

DOROTA BUKOWSKA, BARTOSZ KEMPISTY<sup>\*,\*\*</sup>, SYLWIA CIESIÓŁKA<sup>\*</sup>,  
HANNA PIOTROWSKA<sup>\*\*\*</sup>, PAWEŁ ANTOSIK, MAGDALENA WOŻNA,  
SZYMON POROWSKI<sup>\*</sup>, EDYTA OCIEPA<sup>\*</sup>, HIERONIM MARYNIAK,  
JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, ARTUR BRYJA<sup>\*</sup>, MICHAŁ NOWICKI<sup>\*</sup>

Katedra Weterynarii, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 52, 61-628 Poznań

<sup>\*</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, <sup>\*\*</sup>Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej, Wydział Lekarski II,  
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

<sup>\*\*\*</sup>Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny,  
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, ul. Dojazd 30, 60-631 Poznań

Bukowska D., Kempisty B., Ciesiółka S., Piotrowska H., Antosik P., Woźna M.,  
Porowski S., Ociepa E., Maryniak H., Jaśkowski J. M., Bryja A., Nowicki M.

**Molecular aspects of cytoplasmic and nuclear maturation of pig oocytes**

## Summary

The development of pig reproductive biotechnology has made it possible to use this species not only as farm animals but also as important models in biomedical research. Systems based on pig embryos from *in vitro* fertilization (IVF) are used much more frequently, although the quality of these embryos differs from those produced by *in vivo* fertilization. The most frequent problems in the IVF procedure are disturbances in both nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, and the mechanism of polyspermy specific for this species. Although there has been progress in increasing the number of oocytes produced by *in vitro* maturation processes, the quality of embryos from these oocytes and their developmental competence is still unsatisfactory. It has been suggested that the most important factor in this process is the establishment of optimal conditions for the development and maturation of oocytes.

In this review the authors attempt to explain the molecular basis of oocyte maturation, meiosis resumption, and meiotic spindle assembly. The article is also an opportunity to use the knowledge gained to date in order to increase the efficiency of animal breeding, to evaluate the genetic value of oocytes, as well as to improve assisted reproductive techniques (ART).

**Keywords:** oocytes maturation, *in vitro*, MPF, PKC

Proces dojrzewania oocytów składa się z dwóch głównych etapów: dojrzewania jądrowego oraz dojrzewania cytoplazmatycznego. Dojrzewanie jądrowe obejmuje szereg przemian zapoczątkowanych przed-owulacyjnym wyrzutem LH, polegających na wznowieniu i poprawnym przebiegu podziału mejotycznego, czego skutkiem jest wyrzucenie pierwszego ciała kierunkowego oraz redukcja liczby chromosomów. Mimo że oocyty kończące etap dojrzewania jądrowego mogą być skutecznie zapłodnione, rozwój zarodka jest w większości przypadków zaburzony na skutek braku ważnych czynników cytoplazmatycznych. Prawidłowy rozwój zarodka jest uzależniony od ściślej synchronizacji zarówno etapu dojrzewania jądrowe-

go, jak i dojrzewania cytoplazmatycznego. Osiągnięcie dojrzałości cytoplazmatycznej nie jest jednak równoznaczne z osiągnięciem pełnej dojrzałości oocytu, ponieważ w hodowli *in vitro* może dojść do zaburzeń w epigenetycznej modyfikacji genów, skutkiem czego jest nieprawidłowy rozwój zarodka i płodu (34).

## Dojrzewanie jądrowe (nuclear maturation)

Oocyty o średnicy  $\leq 90 \mu\text{m}$  nie są zdolne do wznowienia podziału mejotycznego w warunkach *in vitro*. Pozbawienie tej właściwości nie jest jednak związane z brakiem czynnika indukującego dojrzewanie (MPF – maturation promoting factor) lub kinazy aktywującej podziały komórkowe (MAPK – mitogen-activated protein kinase), czyli dwóch czynników odpowiedzialnych za wznowienie podziałów mejotycznych (32).

<sup>\*)</sup> Praca finansowana w ramach grantu „OPUS” 2011/03/B/NZ4/02411

Dojrzewające oocyty zawierają ufosforylowaną formę białka p34<sup>cdc2</sup>, jednak jest ona pozbawiona zdolności aktywowania białka MPF do momentu, w którym komórki te nie uzyskają pełnego wzrostu. Sun i wsp. (41) wykazali, że ilość dwóch izoform kinazy MAP, tj. p44<sup>ERK1</sup> oraz p42<sup>ERK2</sup> w rosnących oocytach jest porównywalna do ich zawartości w oocytach w pełni dojrzałych. Stwierdzono również, że białko MPF nie może być aktywowane w oocytach, jeżeli ich wzrost odbywa się w warunkach *in vitro*. Utrzymywanie rosnących oocytów w hodowli *in vitro* w obecności kwasu okadeinowego – inhibitora białkowej fosfatazy 1 i 2A – prowadziło do aktywacji zarówno białka MPF, jak i kinazy MAP. Skutkiem tych procesów było wznowienie podziału mejotycznego i dojrzewania oocytów. Udowodniono tym samym, że uzyskanie przez oocyt zdolności do wznowienia podziału mejotycznego oraz kontynuowanie wzrostu wykazuje silną korelację ze zdolnością tych komórek do aktywacji białka MPF i kinazy MAP (18). Nie jest to natomiast związane z całkowitą ilością tychże białek.

### Aktywacja pierwszego podziału mejotycznego

Do pełnej aktywności mejotycznej w oocytach świni dochodzi w pęcherzykach jajnikowych o średnicy  $\geq 3$  mm (3, 6, 27). Aktywacja podziału mejotycznego następuje w momencie, gdy oocyty uwalniają się ze środowiska pęcherzykowego i są utrzymywane w warunkach *in vitro* przez 20-24 godzin. W proces aktywacji podziałów mejotycznych zaangażowanych jest szereg kinaz białkowych. Należą do nich: kinaza aktywująca podziały komórkowe (MAPK – mitogen-activated protein kinase), czynnik indukujący dojrzewanie (MPF – maturation promoting factor), kinaza białkowa C (PKC – protein kinase C) oraz cykliczny adenozymonofosforan (cAMP – cyclic adenosinomonophosphate).

Podczas dojrzewania oocytów aktywacja białka MPF następuje w stadium zaniku osłonki jądrowej (GVBD – germinal vesicle breakdown). Ilość tego białka istotnie wzrasta w stadium metafazy I podziału mejotycznego, a następnie obniża się podczas przejścia z anafazy do telofazy I podziału mejotycznego. Wysokie stężenie MPF ponownie pojawia się w metafazie II podziału mejotycznego (29). Badania Prochazki i wsp. (35) dowiodły, że wstrzyknięcie cytoplazmy dojrzałego oocytu do niedojrzałej komórki prowadziło do osiągnięcia stadium GVBD po 8 godzinach utrzymywania oocytów w hodowli *in vitro*. Natomiast zahamowanie aktywności MPF uniemożliwia osiągnięcie tego stadium. Zablokowanie syntezy białka p34<sup>cdc2</sup> prowadziło do zahamowania tworzenia się wrzeciona podziałowego. Proces aktywacji MPF odbywa się na drodze fosforylacji białka p34<sup>cdc2</sup> oraz syntezy cykliny B. Zwiększanie stężenia MPF w oocytach w celu uzyskania pełnej aktywności wymaga ciągłej syntezy obydwu tych białek (35).

Białko MAPK występuje w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV – germinal vesicle) w formie nieaktywnej. Staje się aktywne w momencie wejścia w stadium GVBD. Sugeruje się, że w stadium przejściowym pomiędzy fazą G2 a M cytoplazmatyczna kinaza MAP ulega przemieszczeniu do pęcherzyka zarodkowego (25).

Badania Inoue i wsp. (15) wykazały, że wstrzyknięcie aktywnego białka MAPK do świńskich oocytów przyspiesza znacznie wejście oocytów w stadium GVBD, aczkolwiek wstrzyknięcie do oocytów antysensownego RNA kodującego białko c-mos, regulującego ekspresję kinazy MAP, nie miało wpływu na osiągnięcie przez komórki tego stadium. Opisane wyniki badań udowodniły, że wejście oocytów w stadium GVBD jest niezależne od aktywacji kinazy MAP (33). Utrzymywanie dojrzewających oocytów w warunkach *in vitro* w obecności PD98059 i U0126 jako inhibitorów białka MEK hamuje aktywność kinazy MAP, zarówno w oocytach otoczonych komórkami wieńca promienistego, jak i w oocytach enukleowanych (22). Stadium GVBD mogą osiągnąć wyłącznie oocyty otoczone komórkami wieńca promienistego, co sugeruje, że aktywacja kinazy MAP w tych komórkach jest niezbędna dla rozpoczęcia podziału mejotycznego (33).

W oocytach świń zidentyfikowano kilka izoform kinazy białkowej C. Sugeruje się, że aktywacja PKC prowadzi do zahamowania wejścia oocytów pozbawionych komórek wieńca promienistego w stadium GVBD. Rola ekspresji PKC w oocytach otoczonych wieńcem komórek pozostaje nadal niewyjaśniona (43). Istnieją doniesienia mówiące, że użycie aktywatorów PKC w hodowli oocytów hamuje lub znacznie opóźnia rozpoczęcie podziału mejotycznego w tych komórkach (17), jednakże wyniki badań innych zespołów wskazują na stymulujące działanie aktywatorów PKC na tempo dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro* (8). Badania Su i wsp. (40) udowodniły, że czynniki hamujące aktywność PKC wywołują jednocześnie zablokowanie przejścia oocytów do podziału mejotycznego indukowanego FSH w warunkach *in vitro*. Ekspresja PKC oraz transdukcja sygnału z udziałem tego białka, odbywająca się w komórkach wieńca promienistego, jest ściśle związana z aktywacją podziału mejotycznego.

Stężenie cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP) w oocytach świni osiąga najwyższą wartość w 8. godzinie utrzymywania tych komórek w warunkach *in vitro*. Następnie po 12 i 28 godzinach jego ilość ulega znacznemu obniżeniu (38). Obecność cAMP w oocytach odgrywa bardzo ważną rolę we wznowieniu podziału mejotycznego. Hodowla oocytów w obecności forskolin lub IBMX hamuje ich zdolność do aktywacji podziału mejotycznego (38). Zahamowanie aktywności kinazy białkowej A (PKA) zależnej od cAMP uniemożliwia oocytom osiągnięcie stadium

GVBD. Uważa się, że odpowiednio wysokie stężenie cAMP hamuje osiągnięcie tego stadium w mechanizmie dezaktywacji kinazy MAP (16). Stymulowane przez LH wznowienie mejozy wewnątrz oocyty zostaje zapoczątkowane drastycznym spadkiem poziomów cAMP. Za spadek ten odpowiedzialna jest zaktywowana po zadziałaniu LH fosfodiesteraza cAMP (PDE3A – cAMP phosphodiesterase), która degradowuje cAMP. Alternatywną możliwością jest ograniczona dyfuzja cGMP i/lub cAMP z komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego do oocyty, która również zdaje się przyczyniać do wznowienia mejozy (36).

### **Tworzenie struktur mejotycznych – rola kinazy MAP/p90<sup>sk</sup>**

Ufosforylowana forma kinazy MAP oraz białko p90<sup>sk</sup> są związane z obszarem gromadzenia się mikrotubul (37). Położenie to zmienia się po osiągnięciu przez oocyty stadium GVBD. Początkowo w stadium metafazy I podziału mejotycznego białka te są rozmieszczone w obszarze wokół kondensujących chromosomów wrzeciona kariokinetycznego. W anafazie I są zlokalizowane na jednym z biegunów komórki. W stadium przejściowym pomiędzy anafazą I a telofazą I układają się w środkowej strefie wydłużającego się wrzeciona podziałowego (11). Sugeruje się, że położenie kinazy MAP oraz białka p90<sup>sk</sup> jest silnie związane z centrum organizacji mikrotubul wrzeciona podziałowego (42). Białka te wykazują najwyższy stopień ufosforylowania podczas przejścia ze stadium MI do MII (26). Okres ten charakteryzuje się wyraźnym gromadzeniem mikrotubul i tworzeniem wrzeciona podziałowego (33). Obniżenie aktywności kinazy MAP ma miejsce podczas przejścia ze stadium anafazy I do telofazy I. Zahamowanie aktywności tego białka podczas przejścia z fazy MI do MII jest przyczyną zaburzeń w procesie wyrzucenia pierwszego ciała kierunkowego i tworzenia wrzeciona podziałowego w stadium MII (11). Podsumowując powyższe wyniki badań można stwierdzić, że białka te odgrywają istotną rolę w regulacji procesu organizacji mikrotubul wrzeciona podziałowego oocytów świni.

### **Zatrzymanie podziału w stadium metafazy II**

Wysoka aktywność białka MPF oraz kinazy MAP w oocytach ssaków działa jak czynnik cytostatyczny (CSF – cytostatic factor) i powoduje zatrzymanie cyklu w fazie MII. MPF jest uważany za bardzo istotny element czynnika CSF zaangażowany w ten mechanizm. Zdolność do wznowienia podziału przez oocyty jest uzależniona od obniżenia aktywności białka MPF (11, 43). Zahamowanie aktywności tego białka oraz degradacja cykliny B są przyczynami przejścia oocytów z fazy MII do anafazy II i telofazy II (30). Uzyskane wyniki wskazują na aktywny udział kinazy MAP i białka p90<sup>sk</sup> w mechanizmie odpowiedzialnym za zatrzymanie podziałów w stadium MII (33). Hodowla

oocytów świni w obecności U0126 jako inhibitora białek MAP i p90<sup>sk</sup> indukuje przejście komórek z fazy MII do interfazy (38). Mechanizm współdziałania obu tych białek został po raz pierwszy opisany w oocytach *Xenopus* (12).

### **Dojrzewanie cytoplazmatyczne (cytoplasmic maturation)**

Uzyskanie przez oocyt dojrzałości cytoplazmatycznej warunkuje zarówno jego zdolność do zapłodnienia, jak również do zapoczątkowania oraz kontynuacji podziałów mitotycznych zarodka (34). Dojrzewanie cytoplazmatyczne jest złożonym procesem regulowanym przez mechanizmy, które nie zostały jeszcze dobrze poznane, zwłaszcza w porównaniu ze znajomością mechanizmów towarzyszących dojrzewaniu jądrowemu (34, 41). Podzielić je można na trzy główne procesy: (1) przemieszczanie się organelli, (2) reorganizację cytoszkieletu oraz (3) dojrzewanie molekularne (9, 28).

Ruch organelli w ciągu dojrzewania komórki zachodzi dzięki działaniu mikrofilamentów i mikrotubul cytoszkieletu, a sama zmiana położenia organelli zależy od potrzeb komórki w ciągu każdego stadium rozwoju (9). U świń przed rozpoczęciem dojrzewania oocyty mitochondria tworzą skupiska w obwodowej (korowej) części komórki, podczas gdy w miarę dojrzewania zauważyć można ich translokację do obszaru okołojądrowego (7, 44). Przypuszcza się, że mitochondria leżące w rejonie okołojądrowym zapewniają odpowiednią ilość ATP niezbędną do zapoczątkowania fazy GVBD. Dalsze gromadzenie się mitochondriów w obszarze okołojądrowym już po GVBD jest prawdopodobnie spowodowane wysokim zapotrzebowaniem energetycznym podczas formowania wrzeciona podziałowego, kondensacji chromatyny, przemieszczania chromosomów oraz wyrzucenia ciała kierunkowego (44).

Biochemiczne i strukturalne zmiany w retikulum endoplazmatycznym zachodzące podczas dojrzewania są decydujące dla właściwego działania wewnątrzkomórkowej regulacji wapnia. W cytoplazmie dojrzałych oocytów ER zbiera się w postaci małych skupisk o szerokości 1-2 μm, zwłaszcza w rejonie z ziarnami korowymi. Takiego gromadzenia nie stwierdzano w niedojrzałych oocytach zatrzymanych w stadium profazy I. U różnych gatunków skupiska ER widoczne są po stronie przeciwnej do wrzeciona mejotycznego (24, 46).

W czasie dojrzewania oocytów zaobserwować można również reorganizację ziaren korowych, polegającą na ich odśrodkowej migracji i utworzeniu pojedynczej warstwy bezpośrednio pod błoną komórkową. Taka relokalizacja przygotowuje oocyty do przeprowadzenia reakcji korowej, czyli egzocytozy zawartości ziaren korowych do przestrzeni okołozółtkowej (14, 49).

Spośród trzech rodzajów struktur białkowych tworzących cytoszkielet komórki zwłaszcza mikrotubule i mikrofilamenty wydają się związane z dojrzewaniem oocyty. Mikrotubule uczestniczą w redystrybucji organelli (zwłaszcza mitochondriów) oraz w segregacji chromosomów w obrębie wrzeciona mejotycznego. Mikrofilamenty również uczestniczą w dynamicznych zdarzeniach w ciągu dojrzewania oocytów i zapłodnienia poprzez regulowanie redystrybucji retikulum endoplazmatycznego i ziaren korowych oraz pozycjonowanie chromosomów (28, 45). U świń nie stwierdza się mikrotubul w oocytach zatrzymanych w profazie I, natomiast po GVBD zaobserwować można małe mikrotubule astralne w pobliżu skondensowanej chromatyny. Także filamenty aktynowe podlegają reorganizacji w ciągu dojrzewania oocytów świń. Mikrofilamenty obserwowano w postaci stosunkowo grubej jednolitej warstwy w korowej części cytoplazmy, a także stwierdzano ich obecność w całej cytoplazmie oocytów w stadium GV. Po GVBD mikrofilamenty koncentrowały się blisko chromatyny (7, 23). Dane te sugerują, że zarówno mikrotubule, jak i mikrofilamenty biorą aktywny udział we właściwym ułożeniu i segregacji chromosomów podczas dojrzewania jądrowego. Reorganizacja cytoszkieletu oocyty wydaje się decydującym zdarzeniem nie tylko dla dojrzałości jądrowej, ale również dla uzyskania kompetencji rozwojowych (28).

Trzeci aspekt dojrzewania oocytów obejmuje syntezę i gromadzenie RNA oraz białek niezbędnych do ich wzrostu, dojrzewania, a także do wczesnego rozwoju zarodka. Synteza ta jest największa w najwcześniejszych fazach rozwoju oocyty, natomiast pod koniec jego wzrostu i w czasie dojrzewania dominującymi procesami stają się wyciszenie transkrypcyjnej aktywności oraz degradacja niektórych mRNA. Po wyciszeniu transkrypcji oocyty opierają się na zgromadzonych transkryptach, zarówno jeśli chodzi o kontynuowanie mejozy, jak i o przeprowadzenie pierwszych podziałów po zapłodnieniu (10, 39).

Wiele spośród oocytów dojrzewających w warunkach *in vitro* nie posiada zdolności do podjęcia podziału mejotycznego. Sugeruje się, że za prawidłowy rozwój i dojrzewanie tych komórek są odpowiedzialne tzw. czynniki cytoplazmatyczne (cytoplasmic factors) (4, 19), dotychczas jednak nie zidentyfikowano białek, które mogłyby pełnić funkcję tych czynników. Sugeruje się, że istotną rolę w złożonym procesie dojrzewania odgrywa ruch mitochondriów do wnętrza cytoplazmy. W przypadku oocytów utrzymywanych w warunkach *in vitro* proces ten jest zahamowany lub w znacznym stopniu spowolniony (44). Udowodniono, że dodanie do pożywki, w której hodowane są oocyty: cysteiny, cysteaminy, glutaminianu, gonadotropin, nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF – epidermal growth factor) lub  $\beta$ -merkaptopoetanolu wpływa stymulująco na dojrzewanie oocytów w warunkach poza-

ustrojowych (1, 13, 48). Wewnątrzkomórkowe stężenie glutationu zostało wykorzystane jako marker określający zdolność cytoplazmy oocyty do indukcji procesu dekondensacji chromatyny jądra komórkowego plemnika oraz formowania męskiego przedjądrza (1, 48). Właściwy przebieg tych procesów jest związany ze stopniem dojrzałości oocyty (2). Zdolność do przepływu sygnałów pomiędzy oocytem a komórkami wieńca promienistego jest uważana za istotny element regulujący dojrzewanie tych komórek pod wpływem czynników cytoplazmatycznych. W przypadku zahamowania tej drogi komunikacji, stężenie glutationu ulega znacznemu obniżeniu (31).

### Podsumowanie

Dojrzewanie oocytów to długi proces, w czasie którego uzyskują one zdolność do przejścia przez kolejne etapy rozwoju. Obejmuje ono złożone i odrębne, choć powiązane ze sobą mechanizmy dojrzewania jądrowego i cytoplazmatycznego. Oocyt jest uważany za dojrzały, gdy wyrzucone zostaje pierwsze ciało kierunkowe, a sama komórka zostaje zahamowana w stadium metafazy II (dojrzałość jądrowa). Chociaż oocyty takie mogą być zapłodnione, to z powodu braku pewnych czynników cytoplazmatycznych potrzebnych do pełnej dojrzałości cytoplazmatycznej mogą nie mieć kompetencji rozwojowych. Kompetencje takie wiążą się z dojrzałością cytoplazmatyczną oocyty i odnoszą do zdolności komórki jajowej do zapłodnienia i rozwinięcia się w zdrowy zarodek (9, 36).

Wydaje się, że jednym z najistotniejszych elementów w procesie pozyskiwania oocytów w warunkach *in vitro* jest ustalenie optymalnych warunków ich wzrostu i dojrzewania. Ponadto poznanie mechanizmów regulacji ekspresji genów specyficznych dla oocytów pozwoli na opracowanie profilu selekcyjnego dla najlepszych komórek (5, 16, 20, 21). Posługując się analizami molekularnymi można będzie wyselekcjonować te osobniki, których komórki rozrodcze charakteryzują się najwyższymi kompetencjami rozwojowymi, a co za tym idzie – największym prawdopodobieństwem zapłodnienia i prawidłowego rozwoju zarodka.

### Piśmiennictwo

1. Abeydeera L. R., Wang W. H., Cantley T. C., Prather R. S., Day B. N.: Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 1998, 50, 747-756.
2. Abeydeera L. R., Wang W. H., Cantley T. C., Rieke A., Murphy C. N., Prather R. S., Day B. N.: Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 2000, 54, 787-797.
3. Antosik P., Kempisty B., Bukowska D., Jackowska M., Włodarczyk R., Budna J., Brüßow K. P., Lianeri M., Jagodziński 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 puberal gilts. *J. Reprod. Dev.* 2009, 55, 588-593.
4. Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Lianeri M., Brüßow K. P., Woźna M., Jaśkowski J. M.: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein 3 and integrin beta 2 protein levels. *Vet. Med. (Praha)* 2010, 55, 154-162.

5. *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. (Praha)* 2010, 55, 512-521.
6. *Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Woźna M., Bukowska D., Brüßow K. P., Bryja A., Jaśkowski J. M.*: Are the levels of Cdk4 and Cx43 proteins of porcine oocytes associated with follicular size? *Anim. Biology* 2011, 61, 211-224.
7. *Brevini T. A. L., Cillo F., Antonini S., Gandolfi F.*: Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 98, 23-38.
8. *Coskun S., Lin Y. C.*: Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 1995, 42, 311-317.
9. *Ferreira E. M., Vireque A. A., Adona P. R., Meirelles F. V., Ferriani R. A., Navarro P. A. A. S.*: Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009, 71, 836-848.
10. *Fuente R. de la, Eppig J. J.*: Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev. Biol.* 2001, 229, 224-236.
11. *Goto S., Naito K., Ohashi S., Sugiura K., Naruoka H., Iwamori N., Tojo H.*: Effects of spindle removal on MPF and MAP kinase activities in porcine matured oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 63, 388-393.
12. *Gross S. D., Schwab M. S., Lewellyn A. L., Maller J. L.*: Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90. *Science* 1999, 286, 1365-1367.
13. *Gruppen C. G., Nagashima H., Nottle M. B.*: Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol. Reprod.* 1995, 53, 173-178.
14. *Hatanaka Y., Nagai T., Tobita T., Nakano M.*: Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1992, 95, 431-440.
15. *Inoue M., Naito K., Nakayama T., Sato E.*: Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 1998, 58, 130-136.
16. *Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosińska E., Woźna M., Jagodziński P., Jaśkowski J. M.*: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 79-85.
17. *Jung T., Lee C., Moor R. M.*: Effects of protein kinase inhibitors on pig oocyte maturation in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 1992, 32, 461-473.
18. *Kanayama N., Miyano T., Lee J.*: Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote* 2002, 10, 261-270.
19. *Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński 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, 56, 367-378.
21. *Kempisty B., Jackowska M., Piotrowska H., Antosik P., Woźna M., Bukowska D., Brüßow K. P., Jaśkowski J. M.*: Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin  $\beta 2$  (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 2011, 75, 1525-1535.
22. *Kikuchi K., Naito K., Noguchi J., Kaneko H., Tojo H.*: Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro. *Clon. Stem. Cell* 2002, 4, 211-222.
23. *Kim N. H., Funahashi H., Prater R. S., Schatten G., Day B. N.*: Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, 43(2), 248-255.
24. *Kline D.*: Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2000, 50, 125-154.
25. *Liang C. G., Su Y. G., Fan H. Y., Schatten H., Sun G. Y.*: Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol. Endocrinol.* 2007, 21, 2037-2055.
26. *Marchal R., Feugang J. M., Perreau C., Venturi E., Terqui M., Mermillod P.*: Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 2001, 56, 17-29.
27. *Marchal R., Vigneron C., Perreau C., Bali-Papp A., Mermillod P.*: Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 2002, 57, 1523-1532.
28. *Marteil G., Richard-Parpaillon L., Kubiak J. Z.*: Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 203-224.
29. *Mattioli M., Galeati G., Bacci M. L., Barboni B.*: Changes in maturation-promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 30, 119-125.
30. *Miyano T., Dai Y., Lee J., Kano K., Moor R. M.*: Degradation of pig cyclin B1 molecules precedes MAP kinase dephosphorylation during fertilization of the oocytes. *Zygote* 2000, 8, 153-158.
31. *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.
32. *Nanassy L., Lee K., Javor A., Machaty Z.*: Changes in MPF and MAPK activities in porcine oocytes activated by different methods. *Theriogenology* 2007, 68, 146-152.
33. *Ohashi S., Naito K., Sugiura K., Iwamori N., Goto S., Naruoka H., Tojo H.*: Mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 604-609.
34. *Opiela J., Kątska-Książkiewicz L.*: Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. Cz. II. Regulacja dojrzłości cytoplazmatycznej i genomowej. *Biotechnologia* 2005, 2, 151-162.
35. *Prochazka R., Motlik J., Fulka J.*: Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cell Differ. Dev.* 1989, 27, 175-181.
36. *Sanchez F., Smitz J.*: Molecular control of oogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1822, 1896-1912.
37. *Schuon C., Ebeling S., Meinecke B.*: Phosphorylation pattern of the p90rsk and mitogen-activated protein kinase (MAPK) molecule: comparison of in vitro and in vivo matured porcine oocytes. *Zygote* 2007, 15, 215-23.
38. *Shimada M., Terada T.*: Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34cdc2 kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 62, 124-131.
39. *Sirard M. A.*: Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001, 55, 1241-1254.
40. *Su Y. Q., Xia G. L., Byskov A. G., Fu G. D., Yang C. R.*: Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 53, 51-58.
41. *Sun Q. Y., Lai L., Bonk A., Prather R. S., Schatten H.*: Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size and protein synthesis inhibition. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 59, 131-137.
42. *Sun Q. Y., Lai L., Wu G. M., Park K. W., Day B. N., Prather R. S., Schatten H.*: Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, gamma-tubulin, and MAP kinase. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 60, 481-490.
43. *Sun Q. Y., Rubinstein S., Breitbart H.*: MAP kinase activity is downregulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 52, 380-386.
44. *Sun Q. Y., Wu G. M., Lai L., Park K. W., Cabot R., Cheong H. T., Day B. N., Prather R. S., Schatten H.*: Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 2001, 122, 155-163.
45. *Sun Q. Y., Schatten H.*: Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006, 131, 193-205.
46. *Stricker S. A.*: Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Sem. Cell. Dev. Biol.* 2006, 17, 303-313.
47. *Tatemoto H., Muto N.*: Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following parthenogenetic activation in porcine oocytes. *Zygote* 2001, 9, 15-23.
48. *Wang W. H., Niwa K.*: Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zygote* 1995, 3, 345-350.
49. *Wang W. H., Sun Q. Y., Hosoe M., Shioya Y., Day B. N.*: Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol. Reprod.* 1997, 56, 1376-1382.

Adres autora: dr Bartosz Kempisty, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: etok@op.pl