

# CHARACTERIZATION OF NITRIC OXIDE-DEPENDENT PATHWAY REGULATING THE ACTIVATION OF PIG OOCYTES

## Bližší charakteristika NO-dependentní signální kaskády regulující partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů

Michal JEŠETA<sup>1</sup>, Jaroslav PETR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KVD AF ČZU; <sup>2</sup>VÚŽV, ODDĚLENÍ REPRODUKČNÍ BIOLOGIE, PRAHA 10

### **Souhrn, klíčová slova**

V našich předchozích experimentech jsme prokázali existenci NO-dependentní signální kaskády, která je s to navodit partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů dozrálých v podmínkách *in vitro*. V této studii jsme se pokusili tuto signální kaskádu dále charakterizovat. Prokázali jsme, že pro aktivaci je kritických prvních 10 hodin po ošetření NO-donorem. Inhibitory guanylát cyklázy LY83583 a ODQ potlačily aktivaci vyvolanou NO-donorem SNAP. Na druhé straně jsme ale nepozorovali nárůst % aktivity po kultivaci oocytů s NO-donorem SNAP a 8-Br-cGMP, který analogem cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) odolného k fosfodiesterázám. Z těchto dat usuzujeme, že NO-dependentní partenogenetická aktivace prasečích oocytů vyvolává aktivaci guanylát cyklázy. Tato aktivace vede k takové produkci cGMP, že další zvýšení hladin cGMP simulované podáním 8-Br-cGMP již nevede ke zvýšení aktivity oocytů.

Oocyte, prase, meioza, oxid dusnatý, cGMP, partenogenetická aktivace

### **Summary, keywords**

In our previous study we have clearly demonstrated NO-dependent parthenogenetic activation of *in vitro* matured pig oocytes. In this study we demonstrated, that this pathway activated guanylate cyclase and is cGMP-dependent. NO-induced activation was suppressed by inhibitors of guanylate cyclase LY83583 or ODQ but was not further enhanced by phosphodiesterase-resistant cGMP analogue 8-Br-cGMP. At least 10 h treatment with SNAP (2mM) is necessary for full activation of oocytes.

Oocyte, pig, meiosis, nitric oxide, cGMP, parthenogenetic activation

### **Introduction – Úvod**

Reprodukční biotechnologie mohou významně napomoci ve zvýšení účinnosti šlechtění i při získávání živočišných produktů vyšší kvality nebo produktů zcela nových. Účinnost těchto postupů je ale velmi nízká. To je důsledek velmi omezených znalostí i biologických procesech probíhajících ve vajíčcích hospodářsky významných živočišných druhů. Prase není v tomto směru výjimkou. V předchozích experimentech jsme prokázali existenci NO-dependentní signální kaskády, jež reguluje partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů dozrálých *in vitro* (Etrych, Petr 2002). V této studii jsme se snažili tuto signální kaskádu dále charakterizovat.

### **Methods - Metody**

Pro studii byly použity oocyty odebrané z ovárií prasnic poražených na jatkách. Oocyty byly kultivovány 48 hodin v modifikovaném médiu M199 a následně vystaveny aktivačnímu ošetření NO-donorem SNAP současně s inhibitory guanylát cyklázy LY83583 a ODQ či s analogem cGMP (8-Br-cGMP) odolným vůči endogenním fosfodiesterázám.

### **Results - discussion – Výsledky - diskuse**

Prasečí oocyty dozrálé v podmínkách *in vitro* lze partenogeneticky aktivovat pomocí NO-donoru SNAP. Ošetření oocytů 2 mM SNAP vyvolalo aktivaci u 78% oocytů. Pro aktivaci je nezbytné, aby ošetření trvalo nejméně 4 hod (aktivace 24%). S prodlužující se

expozicí podíl aktivovaných oocytů stoupá (10 hod – 68% aktivovaných oocytů). Tato NO-dependentní partenogenetická aktivace zjevně zahrnuje cGMP-dependentní kroky, protože ji lze blokovat inhibitory guanylát cyklázy LY83583 (40  $\mu$ M – aktivace 12%) nebo ODQ (400  $\mu$ M – 23% aktivovaných oocytů). Snaha posílit aktivační účinky SNAP přidávkou 8-Br-cGMP (do 1 mM) nepřinesly zvýšení podílu aktivovaných oocytů při ošetření oocytů NO-donorem SNAP v rozmezí koncentrací 0,1 až 2 mM.

Tyto výsledky naznačují, že se produkce cGMP guanylát cyklázou významně podílí na procesech spojených s NO-dependentní aktivací oocytů prasete. Na druhé straně se ale zdá, že produkce cGMP není limitujícím prvkem, protože po podání 8-Br-cGMP nedochází k vzestupu podílu aktivovaných oocytů ani v případě použití suboptimálních koncentrací NO-donoru SNAP.

V následných experimentech se proto zaměříme na další možné regulační prvky signální kaskády, např. na možnost, že NO-donory vyvolávají aktivaci ryanodinových receptorů jejich nitrosylací.

### **References - Použitá literatura**

Etrych M., Petr J. (2002) Aktivace prasečích oocytů dozrálých *in vitro* signální kaskádou závislou na oxidu dusnatém. Konference AF ČZU v Praze, 25.-26.9.2002, Praha, 2002.

Řešeno v rámci grantu MŠMT 21230/1321/213203