

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Dagmar CEKET

**ULTRASTRUKTURA OOGONIJEV IN ZGODNJIH  
OOCIT V JAJČNIKU MOČERILA  
(*Proteus anguinus anguinus*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Dagmar CEKET

**ULTRASTRUKTURA OOGONIJEV IN ZGODNJIH OOCIT V  
JAJČNIKU MOČERILA (*Proteus anguinus anguinus*)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**OOGONIA AND EARLY OOCYTES ULTRASTRUCTURE IN THE  
OVARY OF PROTEUS (*Proteus anguinus anguinus*)**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Ceket D. Ultrastruktura oogonijev in zgodnjih oocit v jajčniku močerila (*Proteus anguinus anguinus*)  
Dipl. delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2011

---

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela poimenovala prof. dr. Borisa Buloga in za somentorico asist. dr. Lilijano Bizjak Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Simona Prevorčnik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka: prof. dr. Jasna Štrus  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: prof. dr. Boris Bulog  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Somentorica: asist. dr. Lilijana Bizjak Mali  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 23. 12. 2011

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Dagmar Ceket

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	597.92:591.465.1(043.2)=163.6
KG	Oogeneza/ultrastruktura/ <i>Proteus anguinus anguinus</i>
AV	CEKET, Dagmar
SA	BULOG, Boris (mentor)/ BIZJAK-MALI, Lilijana (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2011
IN	ULTRASTRUKTURA OOGONIJEV IN ZGODNJIH OOCIT V JAJČNIKU MOČERILA ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> )
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 67 str., 1 pregl., 45 sl., 51 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Ovarijski močerili ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ) smo pregledali s svetlobnim in presevnim elektronskim mikroskopom. V vseh jajčnikih so prisotni oogoniji in previtelogene faze oocit (OI in OII). Oogeniji (Oo) so v skupkih v vezivu robnega dela jajčnika, ki jih obdajajo maloštevilne prefolikularne celice. Sosednji Oo so medsebojno povezani z citoplazemskimi mostički, ki pri zgodnjih oocitah izginejo. Posamezni Oo so redko prisotni. Oolema Oo večinoma ni nagubana in je v neposrednem stiku s plazmalemo prefolikularnih celic, mestoma je prisoten manjši perivitelinski prostor. Jedra so velika z malo jedrci. Mitotske delitve Oo potekajo v jajčnikih neodvisno od letnega časa. V citoplazmi Oo so številni, morfološko raznoliki mitohondriji, več kompleksov GA, kratke cisterne ER, ribosomi ter lipidne kaplje, ki tvorijo manjšo lipidno maso ob jedru. Število celičnih organelov se pri oocitah I in II izrazito poveča, citoplazma je gostejša, izrazit je membranski sistem. Lipidna masa ob jedru oocit I je obsežnejša in se postopno razširi okoli jedra. V jedru oocit so številna jedrca. Za oocite II so značilni vezikli z raznoliko vsebino, ki so različno veliki in razvrščeni v sloju pod oolemo. Površina za izmenjavo snovi med celicami folikularnega ovoja in oocitami se postopno povečuje. Mikrovili oocite in makrovili FC so pri OI kratki, pri OII pa so že daljši in številčnejši.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	597.92:591.465.1(043.2)=163.6
CX	Oogenesis/Ultrastructure/ <i>Proteus anguinus</i>
AU	CEKET, Dagmar
AA	BULOG; Boris (supervisor), BIZJAK-MALI, Lilijana (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
PY	2011
TI	OOGONIA AND EARLY OOCYTES ULTRASTRUCTURE IN THE OVARY OF PROTEUS ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> )
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 67 p., 1 tab., 45 fig., 51 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The <i>Proteus</i> ovaries ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ) were examined by light and transmission electron microscopes. Oogonia and the previtellogenic stages (OI and OII) of oocytes occurred in all of the ovaries. In the connective tissue of the ovarian peripheral part clusters of oogonia (Oo) are found which are surrounded by a few prefollicular cells. The adjacent Oo are interconnected with cytoplasmic bridges, which disappear with early oocytes. Individual Oo are less commonly represented. Oo oolemma is mostly unfolded and it comes into a direct contact with the plasma membrane of prefollicular cells, and in certain parts a minor perivitelline space is present. Nuclei of the Oo are large consisting of a few nucleoli. The mitotic divisions of Oo are represented in ovaries independently of the season. In the cytoplasm of Oo, there are numerous morphologically diverse mitochondria, the multiple repetition of GA, the short cistern of ER, ribosomes and lipid droplets, forming a small mass of the lipid around the nucleus. The number of cell organelles in the oocytes I and II distinctly increases, the cytoplasm is denser, and the membrane system is more conspicuous. The lipid mass is more distinct at the nucleus of oocytes I and it gradually extends around the nucleus. The number of nucleoli in the nucleus of oocytes is larger. Oocytes II are characterized by the vesicles of diverse contents, which are of different sizes and arranged in one layer below oolemma. The area for the exchange of substances between the cells of envelope and oocytes gradually increased. Oocyte microvilli and FC macrovilli are short in OI, however, in OII are longer and more numerous.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI NALOGE.....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 OOGENEZA PRI DVOŽIVKAH.....	3
2.2 MORFOLOGIJA GERMINALNIH CELIC JAJČNIKA DVOŽIVK.....	5
2.3 ZGRADBA ZGODNJIH FAZ JAJČNIH CELIC PRI MOČERILU.....	7
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>10</b>
3.1 MATERIAL.....	10
3.2 METODE .....	11
<b>3.2.1 Parafinske rezine .....</b>	<b>11</b>
3.2.1.1 Histološka barvanja parafinskih rezin.....	12
3.2.1.1.1 Barvanje po Feulgenu.....	13
<b>3.2.2 Poltanke in ultratanke rezine .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.3 Mikroskopiranje .....</b>	<b>14</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>15</b>
4.1 MORFOLOGIJA OOGONIJEV.....	15
4.2 MORFOLOGIJA ZGODNJIH PREVITELOGENIH OOCIT .....	31
<b>4.2.1 Oocite I.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2 Oocite II .....</b>	<b>43</b>
<b>5 DISKUSIJA .....</b>	<b>50</b>
<b>6 SKLEPI.....</b>	<b>57</b>
<b>7 POVZETEK .....</b>	<b>59</b>
<b>8 LITERATURA .....</b>	<b>62</b>
8.1 CITIRANI VIRI.....	62
8.2 ELEKTRONSKI VIRI .....	67

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Podatki o poskusnih živalih .....11

## KAZALO SLIK

Slika 1. Oogeneza pri anurih.....	4
Slika 2 a, b, c. Oogoniji v steni ovarija močerila .....	17
Slika 3 a, b. Citoplazemski mostiček .....	18
Slika 4. Prefolikularna celica .....	18
Slika 5. Odstavek prefolikularne celice .....	19
Slika 6. Jdro prefolikularne celice .....	19
Slika 7 a, b. Citoplazma prefolikularnih celic.....	20
Slika 8 a, b. Medcelični stiki sosednjih prefolikularnih celic .....	20
Slika 9 a, b. Stik oogonija s prefolikularno celico .....	21
Slika 10. Nagubanje sosednjih plazmalem na stiku oogonija.....	21
Slika 11. Jdrce oogonija .....	22
Slika 12. Jedrni ovoj z jedrnimi porami. ....	22
Slika 13 a, b, c. Interfazno jdro oogonija .....	23
Slika 14. Profazna jedra oogonijev .....	24
Slika 15. Jdro oogonija v anafazi .....	24
Slika 16 a, b. Jdro oogonija v telofazi .....	25
Slika 17 a, b, c. Endoplazemski retikulom v citoplazmi oogonija .....	26
Slika 18 a, b, c, d. Mitochondriji v citoplazmi oogonijev .....	27
Slika 19. Mitochondriji z elektronsko svetlim matriksom .....	28
Slika 20 a, b, c, d. Lipidne kaplje v citoplazmi oogonijev .....	29
Slika 21 a, b. Elektronsko gosta telesa .....	30
Slika 22 a, b. Skupki ali kompleksi Golgijskega aparata .....	30
Slika 23 a, b. Skupki lipidnih kapelj .....	32
Slika 24. Jdrce oocite I.....	33
Slika 25. Jedrna membrana, nukleoplazma in citoplazma ob jedru .....	33
Slika 26. Kromosomske niti.....	34
Slika 27 a, b, c. Membranski sistem v citoplazmi oocite I .....	35
Slika 28 a, b. Mitochondriji .....	36
Slika 29 a, b, c. Lipidne kaplje v oociti I .....	37

Slika 30. Golgijev aparat v citoplazmi oocite I.....	38
Slika 31. Mielinska telesa v citoplazmi oocite I .....	38
Slika 32 a, b. Vezikli v citoplazmi oocite I.....	39
Slika 33. Stik oocite s folikularno celico .....	39
Slika 34 a, b. Mikrovili in makrovili .....	40
Slika 35. Stičišče folikularne celice z oocito I.....	40
Slika 36 a, b. Stiki med folikularnimi celicami.....	41
Slika 37 a, b. Citoplazma folikularnih celic.....	41
Slika 38. Lizosomi.....	42
Slika 39 a, b. Jedrca v jedru Oocite II so povečana in številčnejša.....	44
Slika 40. Membranski sistem v citoplazmi OII.....	45
Slika 41 a, b, c, d. Organeli v citoplazmi oocite II.....	46
Slika 42. Anulatne lamele .....	47
Slika 43 a, b. Vezikli (v) v robni citoplazmi oocite II.....	48
Slika 44 a, b. Stik med oocito II in folikularno celico.....	49
Slika 45 a, b. Folikularne celice .....	49

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a - anafazno jedro  
AL - anulatne lamele  
ci - cis stran GA  
cyt O - citoplazma oocite  
cyt Oo - citoplazma oogonija  
Cyt fc - citoplazma folikularne celice  
D - dezmosom  
e - elektronsko gosta sredica lipida  
ER - endoplazemski retikulum  
evc - evkromatin  
f - filamentozni material nizke gostote  
FC - folikularna celica  
GA - Golgijev aparat  
Gly - glikogen  
hc - heterokromatin  
if - intermediarni filamenti  
in - interkromatinske granule  
jp - jedrne pore  
k - kromosomi  
kn - kromatinske niti  
kr - kriste  
L - lipidna kaplja  
lk - lamelarne kriste mitohondrija  
lp - elektronsko gost plašč lipidne kaplje  
M - mitohondrij  
mak - makrovil  
mik - mikrovil  
N - jedro

n - jedrce

Nfc - jedro folikularne celice

OI - oocita pve zoritvene faze

OII - oocita druge zoritvene faze

Oo - oogonij

p - perikromatinske granule

pr - profazno jedro

preFC - prefolikularna celica

Pv - perivitelinski prostor

rl - svetlejši rob lipidne kaplje

s - jedra somatskih celic

tk - tubularne kriste mitohondrija

tr - trans stran GA

v - vezikli

vk - vezikulirane kriste mitohondrija

z - zrna v matriksu mitohondrija

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Ovarijski dvoživki vsebujejo oogonije, ki vsako leto ustvarijo novo generacijo oocit, ki vstopajo v prvo mejotsko profazo. Oogenza poteka postopno in različno pri različnih vrstah glede na okolje, v katerem vrsta živi in mikrolokacije, kjer odlaga jajca, kar omogoča ohranjanje posamezne vrste.

Oogeneza pri močerilu (*Proteus anguinus anguinus*) je slabo raziskana. Vemo, da poteka počasi, kar naj bi bila posledica tega, da kot troglobiontska, neotenična žival živi v podzemnem habitatu. Opisana je bila morfologija jajčnika, določene in opisane pa so bile tudi zoritvene faze jajčnih celic (Bizjak Mali in Bulog, 2010, Talaber, 2008, Žibert, 2010). Glede na velikost, barvo in histološke značilnosti je bilo opisanih pet faz zoritve, dve previtelogeni (oocite I in II) ter tri vitelogene faze (oocite III, IV in V). Jajčne celice se v ovariju razvijajo asinhrono, pojav vitelogenih faz je neodvisen od sezone.

### 1.2 CILJI NALOGE

Oocite se tokom razvoja spreminja. Opazne so izrazite spremembe v morfologiji in velikosti celic. Z diplomskim delom dopolnjujemo rezultate predhodnih raziskav oogeneze močerila. Predvsem smo se osredotočili na zgodnje faze oogeneze, oogonije in previtelogene oocite, na njihovo ultrastrukturo, na stik med sosednjimi jajčnimi celicami, kot tudi med jajčnimi celicami in celicami folikularnega ovoja.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bo skladno z zoritvijo in diferenciacijo jajčnih celic, prišlo do sprememb v ultrastrukturi tako jedra kot citoplazme, kot odraz aktivne sinteze in skladiščenja

proteinov, ribosomov, tRNA, mRNA in morfogenetskih faktorjev. Zaradi povečane potrebe po izmenjavi snovi med celicami ovoja in oocitami se bo postopno povečevala površina oocit in celic folikularnega ovoja.

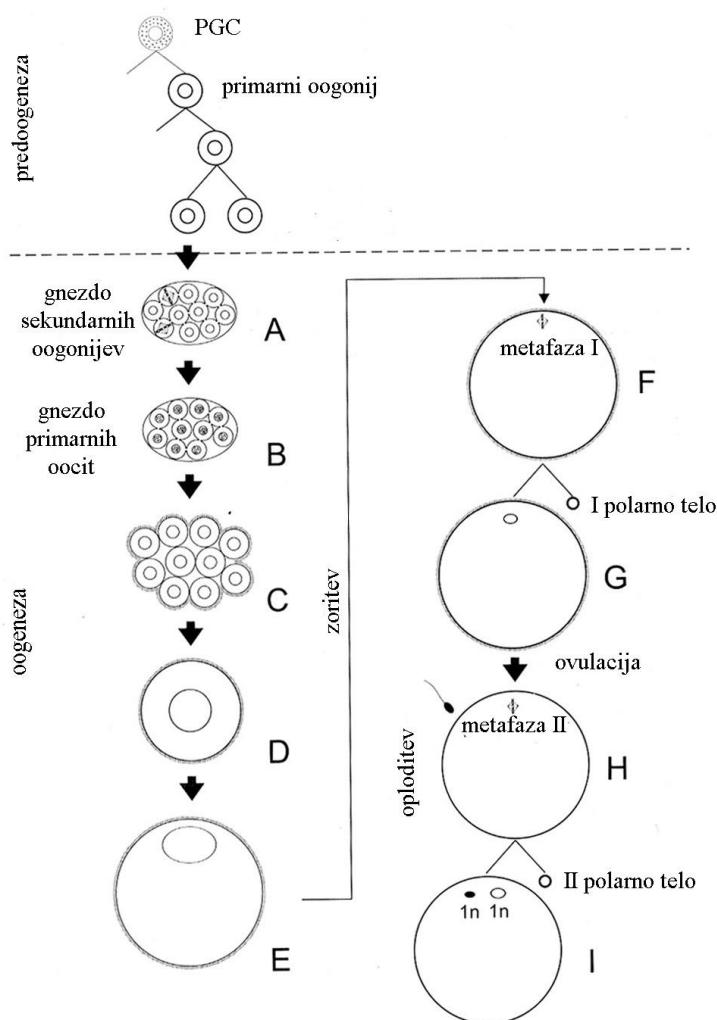
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OOGENEZA PRI DVOŽIVKAH

Večina živali, ki se spolno razmnožujejo nastanejo z združitvijo moške in ženske gamete. Zigota, ki pri tem nastane poleg dednega materiala deduje tudi jajčno citoplazmo, ki doprinese k razvoju zarodka. Ženska gameta predstavlja vez med dvema generacijama. Nastane v procesu oogeneze, kjer se na celičnem in molekularnem nivoju dogajajo številne spremembe tako v jedru, kot v citoplazmi.

V splošnem se za dvoživke navaja, da je oogeneza kontinuiran proces v katerem primarni oogoniji pred vsakim paritvenim obdobjem prenavljajo klično linijo (Gilbert, 2003; Witschi, 1929, 1956, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009). Sledi dvo ali triletna akumulacija rumenjaka, RNA ter rast in dozorevanje celic vse do ovulacije. Ovulirane zrele jajčne celice nadomestijo previtelogene oocite, ki prično z rastjo in nadaljno diferenciacijo, sočasno pa nastaja nova generacija oogonijev z intenzivnimi mitotskimi delitvami.

Ogielska in Bartmańska (2009) sta proces nastajanja in zoritve jajčnih celic razdelili na predoogenezo in oogenezo (sl. 1). V predoogenezi potekajojo intenzivne mitotske delitve primarnih oogonijev, s tem nastajajo gnezda ali skupki sekundarnih oogonijev, ki vstopijo v mejotsko delitev in jih imenujejo primarne oocite. Faza oogeneze nastopi z oblikovanjem gnezd sekundarnih oogonijev (A). Ko sekundarni oogoniji vstopijo v mejotsko delitev jih imenujemo primarne oocite (B). Do pozne pahiten faze prve mejotske delitve so oocite med seboj povezane s citoplazemskimi mostički, ki izginejo, ko oocite vstopijo v diploten fazo razvoja in se prično samostojno razvijati (C). V tem obdobju se razvijajo tudi folikularne celice in obdajo posamezno oocito. Oocite nato rastejo in nadaljujejo z mejotsko delitvijo (D in E). Rezultat prve mejotske delitve (F) je nastanek sekundarne oocite in polarnega telesa (G). Ko je oocita v metafazi druge mejotske delitve pride do ovulacije (H). Mejotska delitev se zaključi z oploditvijo (I).



Slika 1. Oogeneza pri anurih (Ogielska in Bartmańska, 2009).

Med različnimi redovi dvoživk (brezrepci, repate dvoživke, sleporili) obstajajo določene razlike in podobnosti v poteku oogeneze ter morfologiji posameznih zoritvenih faz oocit.

Pri brezrepcih nastajanje novih oogonijev ni kontinuiran proces, intenzivne mitotske delitve potekajo le v juvenilnem obdobju. Zgodnje oocite v diploten fazi, ki so nastale v juvenilnem obdobju zadoščajo za celo rodno obdobje samice (Jorgensen, 1973b, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009; Billeter in Jorgensen, 1976, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009; Callen in sod. 1986, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009; Ogielska in sod., 2007, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009). Oogoniji sicer ne izgubijo sposobnosti delitve, vendar je ta učinkovita samo pri juvenilnih osebkih, pozneje pa novo nastale celice

propadajo (Ogielska in Bartmańska, 2009). Podobno je tudi pri sesalcih, ptičih in hrustančnicah, kjer oogoniji vstopijo v mejozo v juvenilnem obdobju, pri odraslih osebkih pa to ni več mogoče (Tokarz, 1978).

Pri repatih dvoživkah se oogoniji v steni ovarija, vsako reprodukcijsko sezono intenzivno delijo in ustvarjajo nova gnezda oogonijev in posledično nove generacije oocit (Aranzábal, 2009). Po ovulaciji tako vstopi nova serija oogonijev v fazo rasti in nadomesti sproščene zrele jajčne celice (Jorgensen, 1973a, cit. po Tokarz, 1978).

Pri sleporilih je oogeneza nekoliko slabše raziskana. Oogeneza je cikličen proces, saj se oogoniji, tako kot pri repatih dvoživkah, delijo vsako reproduktivno sezono. Jajcerodne vrste imajo letni reprodukcijski cikel, živorodne vrste pa imajo zaradi dolge brejosti (6–7 ali 12 mesecev) dvoleten cikel (Exbrayat, 2009).

## 2.2 MORFOLOGIJA GERMINALNIH CELIC JAJČNIKA DVOŽIVK

Germinalne spolne celice v jajčniku samic imenujemo različno glede na fazo njihovega razvoja (Raven, 1961, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009). Vse izvirajo iz primordialnih zarodnih celic (PGCs), ki imigrirajo v razvijajoči se ovarij. Nastanek klične linije je odvisen od tako imenovane zarodne plazme, ki je morfološko podobna v vseh organizmih in je prepoznavna po fibrilarni citoplazmi, mitohondrijih, elektronsko gostih veziklih in ribosomih (Czolowska 1969, 1972, cit. po Sánchez in Villecco, 2003; Williams in Smith, 1971, cit. po Sánchez in Villecco, 2003). Klične determinante se med brazdanjem razdelijo v določene blastomere in nazadnje v določene celice zarodka, ki postanejo PGC. Pri brezrepcih so PGC zgoščene v posteriornem delu larvalnega črevesa. Od tu potujejo po dorzalnem mezenteriju do gonadnega grebena in razvijajočih se gonad. PGCs so običajno večje celice, ki so morfološko prepoznavne zaradi rumenjakovih ploščic. Z razgradnjo rumenjaka in mitotskimi delitvami nastanejo manjši primarni oogoniji (Ogielska in sod., 2010).

Primarni oogoniji so diploidne celice, ki imajo pri večini dvoživk veliko, režnjevo jedro (Al-Mukhtar in Webb, 1971; Coggins, 1973). Jedro je lahko tudi okroglo z le posameznimi

invaginacijami jedrnega ovoja, kot navajajo za družino pravih žab, *Ranidae* (Ogielska in Wagner, 1990, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009; Ogielska in Kotusz, 2004, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009). Značilni celični organeli oogonijev so mitohondriji, gladki endoplazemski retikulum, ribosomi, mikrotubuli, različni vezikli, anulatne lamele in centrioli (Al-Mukhtar in Webb, 1971; Coggins, 1973, Ogielska in Bartmanska, 2009).

Po več ciklih mitotskih delitev se oblikujejo skupki ali gnezda sekundarnih oogonijev, ki so medsebojno povezani s citoplazemskimi, medceličnimi mostički in obdani s prefolikularnimi celicami (Coggins, 1973). Sekundarni oogoniji so morfološko podobni primarnim, razlike so samo v jedru, ki postane izrazito okroglo oblike, brez kakršnihkoli režnjev ali invaginacij jedrnega ovoja. Poleg tega sekundarne oogonije povezujejo medcelični mostički, ki jih pri primarnih oogonijih še ni (Ogielska in Bartmańska, 2009).

Sekundarni oogoniji se po zadnji mitotski delitvi spremenijo v primarne oocite, ki vstopijo v mejotsko delitev. Zgodnje oocite v leptoten, zigoten in pahiten fazi prve mejotske profaze so pogosto še vedno v gnezdih in so morfološko težje ločljive od sekundarnih oogonijev. Šele v pozni pahiten fazi oocite niso več v skupku in se začno razvijati asinhrono, kar naj bi bilo povezano z izginjanjem intercelularnih mostičkov ob nastopu folikulogeneze (Coggins, 1973). V tem času namreč vsako, razvijajočo se jajčno celico obdajo prefolikularne celice, ki se v postopku imenovanem folikulogeneza ravno tako razvijajo.

Diploten faza mejotske delitve je najdaljsa faza oogeneze in poteka od nekaj mesecev do več let odvisno od vrste dvoživk. V tej fazi razvoj jajčne celice razdelimo na več razredov. Najpogosteje uporabljeni je razdelitev po Dumontu (1972), ki je opisal šest faz zoritev oocit pri žabi krempljičarki *Xenopus laevis* in sicer na podlagi izgleda, barve in velikosti jajčnih celic. Podobni kriteriji in razdelitev se uporabljam tudi za druge dvoživke. Prva in druga faza oocit je previtelogena, tretja, četrta in peta so vitelogene faze oocit, šesto fazo pa predstavljajo oocite v katerih se je vitelogene že končala. Dumontova razdelitev je praktična, vendar je pri oogenezi, tako kot tudi pri drugih razvijajočih se sistemih težko postaviti točno določene meje med posameznimi fazami. Fiziološki procesi, ki se začenjajo v eni fazi, se nadaljujejo v naslednji (Selman in sod., 1993).

Previtelogene oocite prve zoritvene faze se razen po velikosti ločijo od oogonijev tudi po citoplazmi, ki je pri oocitah temnejše obarvana (Eddy in Ito, 1971, cit. po Tokarz, 1978). Oocite so večje in imajo jedro z enim ali dvema jedrcema. Ob jedru je mitohondrijska masa iz celičnih organelov, kot so mitohondriji, ribosomi in kompleksi Golgijevega aparata.

Previtelogene oocite druge zoritvene faze so večje od oocit v prvi zoritveni fazi. Jedro je veliko, okroglo z več jedrci, ki so pomaknjena na preiferijo jedra. Oocite se povečujejo, citoplazma postaja gostejša na račun povečanega števila celičnih organelov, RNA in proteinov (Sánchez in Villecco, 2003).

Razlike med posameznimi redovi dvoživk, so predvsem v velikosti jajčnih celic, v posameznih fazah razvoja, vendar te varirajo tudi znotraj iste skupine.

### 2.3 ZGRADBA ZGODNJIH FAZ JAJČNIH CELIC PRI MOČERILU

Močeril ima dolgo življenjsko dobo in temu primerno dolgo je tudi reprodukcijsko obdobje, ki traja 30 let ali več (Juberthie in sod., 1996). Samičke v povprečju spolno dozorijo pri 15,6 letih in odlagajo od 35 do 70 jajčec vsakih 6 do 12,5 let (Juberthie in sod., 1996; Voituron in sod., 2010). Embriонаlni razvoj je počasen in traja 140 dni pri 10°C in je odvisen od temperature vode (Durand in Delay, 1981).

Metamorfoze pri močerilu ni. Žival tako vse življenje obdrži nekatere larvalne značilnosti, kar naj bi bila posledica zmanjšane občutljivosti nekaterih tkiv na tiroksin, saj je sama žleza ščitnica sicer normalno razvita in aktivno izloča hormon (Langecker, 2000, cit. po sl.wikipedia.org). Govorimo o heterohroniji ozziroma pedomorfnosti. Kljub upočasnjenu somatskemu razvoju, se gonade pri močerilu razvijajo normalno, pojav imenujemo neotenijs.

Do nedavnega je bilo malo znanega o morfologiji ovarija močerila in zoritvenih fazah jajčnih celic. Z raziskavami, v okviru katerih sta bili izdelani tudi dve diplomski deli - Ive Talaber (2008) in Urške Žibert (2010), pa je bila proučevana in opisana morfologija

jajčnika in oocit. Jajčnik je votlega tipa in podolgovate oblike, kar se sklada z obliko telesa same živali. Zrelost jajčnika je povezana s parametri telesa (dolžina, masa telesa).

V svetljino jajčnika segajo oocite, s pecljem pripete na ovarijsko steno. V njem so, razen oogonijev, zastopane previtelogene ter vitelogene faze oocit. Oogoniji in previtelogene oocite so konstantna zaloga jajčnih celic za zoritve.

Zoritev jajčnih celic ni sezonska, samica lahko odlaga jajca kadarkoli tekom leta. Preferenca odlaganja jajčec je v zimskem obdobju od oktobra do marca (Juberthie in sod., 1996).

Oogoniji so najmanjše jajčne celice v jajčniku močerila in merijo od 25 do 50 µm. So sferične oblike, z malo citoplazme, jedro je veliko, jedrca pa maloštevilna. V citoplazmi so prisotne lipidne kaplje. Pogosto so v skupkih, redkeje posamično.

Previtelogene oocite so prevladujoč tip oocit v oogoniju močerila. Oocite prve zoritvene faze merijo od 100 do 300 µm. Zanje je značilna predvsem prosojna citoplazma in homogena objedrna masa, ki vključuje lipidne kaplje in mitohondrije (Bizjak Mali in Bulog, 2010). Objedrno maso v oocitah dvoživk, zaradi njene zelo različne sestave, posamezni avtorji poimenujejo tudi drugače: rumenjakovo jedro, kot ga je leta 1850 poimenoval Carus (Srivastava, 1948), Balbianijevo telo, po Balbianiju, ki je leta 1879 interpretiral rumenjakovo jedro kot folikularno celico, ki vstopi v oocito, leta 1883 pa zapisal, da rumenjakovo jedro izvira iz germinalnega vezikla (Srivastava, 1948). V novejši literaturi se je poimenovanje nekoliko poenotilo in prevladuje izraz mitohondrijski oblak oziroma mitohondrijska masa. Jedro je veliko s številnimi jedrci. V citoplazmi so lipidne kaplje in številni mitohondriji ter prosti ribosomi; njihovo število pa se tekom rasti celice veča. Obširen je membranski sistem iz gladkih cistern endoplazemskega retikuloma. V citoplazmi je več kompleksov Golgijevga aparata ter anulatne lamele, ki se pogosto stikajo z membranskim sistemom. Oocite I obdajajo maloštevilčne in sploščene folikularne celice, katerih jedra so podolgovata. Mikrovili in makrovili so redki.

Oocite II so večje in merijo med 300 in 600 µm. Povečano je število jedrc na jedrni periferiji. Citoplazma je sicer podobna tisti v oocitah I, vendar so v tej fazi jasno vidni

različno veliki vezikli v robnem delu citoplazme. Mikrovili so v tej fazi daljši in številčnejši, prav tako makrovili folikularnih celic.

V tretji zoritveni fazi oocite merijo od 600 do 1000 µm in so pod lupo videti bele ali rumenkaste barve. Njihova citoplazma je slojevita, v centralnem delu homogena, v kortikalnem pa polna na videz praznih vakuol. Vezikli v robnem delu citoplazme so zaradi povečanja celice manj očitni. Jedrca na periferiji jedra so večja kot v oocitah zgodnejših zoritvenih stopenj.

Vitelinska ovojnica se oblikuje v III. zoritveni fazi, v IV. zoritveni fazi pa se diferencira v zunanji homogeni sloj ter notranji sloj zone radiate. V III. fazi se pojavijo tudi melaninske granule, ki v oocitah IV. zoritvene faze tvorijo kontinuiran sloj pod oolemo, tako da so oocite enakomerno rjavo pigmentirane.

Četrto fazo zoritve oocit delimo glede na količino in razporeditev rumenjakovih ploščic na zgodnjo in pozno. Rumenjakove ploščice se začno kopičiti v zgodnji fazi, tik pod oolemo, v pasu kortikalne citoplazme in ob jedru. V pozni IV. zoritveni fazi pa se, s ploščicami zapolnjeno periferno območje citoplazme, razširi.

Urška Žibert (2010) je v svoji diplomske nalogi opisala tudi V. fazo zoritve oocit pri močerilu. Citoplazma oocit v tej fazi je zapolnjena z rumenjakovimi ploščicami, jedro pa je izrinjeno na periferijo.

Oogenezo spremišča tudi folikulogeneza. Okoli oogonijev so maloštevilne prefolikularne celice, ki tvorijo nesklenjen epitel, oocite I. in II. zoritvene faze pa že obdaja ploščati epitel folikularnih celic, ki so kasneje kubične oblike in številčnejše. Folikularni epitel se ponovno splošči v V. zoritveni fazi.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

V raziskavo je bilo vključenih 11 samic bele podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus* (preglednica 1). Živali so bile žrtvovane v različnih letnih časih, njihova tkiva pa fiksirana že v preteklih letih za raziskave skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

Osebki v našem vzorcu so bile spolno zrele samice, telesne dolžine od 22,6 do 28 cm in teže od 15,3 g do 33,4 g (preglednica 1). Osem osebkov je bilo ujetih v Planinski jami, dva na Otovškem bregu in eden v izviru reke Krupe. Vse živali so bile do žrtvovanja vzdrževane v speleološkem laboratoriju na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, v akvarijih z vodnimi filtrirnimi črpalkami, pri temperaturi 10°C in stalni temi. Razen treh osebkov, ki so bili v poskusih stradanja, so bili osebki hrani enkrat tedensko s postranicami (Crustacea: Amphipoda).

Jajčnike vseh enajstih osebkov smo pregledali s svetlobnim mikroskopom, jajčnike štirih osebkov (P168, P169, P176, P189) pa tudi s presevnim elektronskim mikroskopom.

Preglednica 1. Podatki o poskusnih živalih.

Oznaka osebka	Lokaliteta	Datum fiksacije	Letni čas fiksacije	Dolžina osebka (mm)	Masa živali (g)	Zrelost ovarija *
P 90	Planinska jama	25. 05. 1984	pomlad	235	/	OIV
P 131	Planinska jama	15. 12. 1998	zima	250	/	OIV
P 132**	Planinska jama	21. 01. 1999	zima	226	/	OIV
P 150	Otvorški breg	27. 10. 2000	jesen	280	33,00	OIV
P 157	Otvorški breg	15. 11. 2001	jesen	285	33,40	OIV
P 163	Planinska jama	11. 08. 2003	poletje	246	20,37	OIII
P 168	Planinska jama	26. 11. 2003	jesen	257	21,69	OII
P 169	Planinska jama	26. 11. 2003	jesen	243	19,95	OII
P 176**	Planinska jama	28. 01. 2005	zima	243	15,30	OIII
P 177**	Planinska jama	19. 05. 2005	pomlad	250	19,50	OII
P 189	Izvir Krupe	12. 07. 2007	poletje	226	16, 50	OIII

\* Zrelost ovarija smo določili z najbolj zrelo zoritveno fazo oocit, ki se je pojavila v jajčniku. OII –OIV – zoritvene faze oocit.

\*\* Stradani osebki.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Parafinske rezine

Ovarijs so bili fiksirani v različnih fiksativih (10% formalin, Bouin, Carnoy). Po fiksaciji so bila tkiva ustrezno spirana in dehidrirana v rastoči alkoholni vrsti. Večje kose tkiva smo dehidrirali trikrat po 15 min v 70% etanolu, sledila je dehidracija trikrat po 15 min v 96% etanolu, nato smo postopek ponovili v 100% etanolu. Sledilo je bistrenje v ksilenu dvakrat po 15 min in infiltracija v paraplast, dve menjavi (prvič 4 ure, drugič 12 ur). Pri celotnih

ovarijih je dehidracija v 70% etanolu potekala dvakrat po 30 minut, v 96% etanolu štirikrat po 30 min ter ravno tako štirikrat po 30 min v 100% etanolu. Bistrenje v ksilenu je potekalo dvakrat po 30 min in infiltracija v paraplastu z dvema menjavama (prvič 4 ure, drugič 12 ur).

Parafinske vzorce smo rezali na 5 - 12 µm debele rezine z mikrotomom znamke Reichert Jung 2040.

### 3.2.1.1 Histološka barvanja parafinskih rezin

Prisotnost posameznih kemijskih sestavin celice lahko kvalitativno ugotavljam s pomočjo histokemijskih reakcij, ki nam omogočajo njihovo identifikacijo in lokalizacijo v histološkem preparatu. Osnova vseh histokemijskih reakcij je specifična vezava barvila na določeno kemijsko substanco v preparatu. Ta substanca je bodisi fiziološka sestavina celice ali pa nastane v prvem delu reakcije iz molekul, ki so v celici prisotne.

Preparate smo barvali z vodotopnimi barvili, zato je bilo treba iz rezin odstraniti hidrofobni parafin in jih ponovno hidrirati. Pred barvanjem smo iz rezin s ksilenom najprej odstranili parafin (2 krat po 3 minute), rezine smo nato prenesli v propanol (2 krat po 3 minute) ter jih hidrirali preko padajoče etanolne vrste (96% in 70% etanol; v vsakem 2 krat po 3 minute) do destilirane vode. Po končanem barvanju smo vse rezine najprej sprali z destilirano vodo in nato dehidrirali v 70% in 96% (v vsakem 2 krat po nekaj sekund), jih prenesli v propanol (2 krat po nekaj sekund) in zbistrili v ksilenu (2 krat nekaj sekund ali dlje). Na koncu smo na vsako stekelce kanili Pertex in ga prekrili s krovnim stekelcem.

### 3.2.1.1.1 Barvanje po Feulgenu

Barvanje po Feulgenu je tehnika barvanja, ki se uporablja za identifikacijo kromosomske DNA v celici. Temelji na dveh kemijskih reakcijah: hidrolizi in reakciji nastalih aldehidov s Feulgnovo raztopino (Presnell in Schreibman, 1997). DNA se po barvanju obarva vijolično. Intenziteta dobljene barve, je sorazmerna količini DNA v celici (Kiernan, 1990). Tehnika je predvsem uporabna za študije celičnega cikla.

Po deparafinizaciji in rehidraciji parafinskih rezin smo opravili hidrolizo s 5M HCl. Hidroliza je potekala 60 min na sobni temperaturi. Vzorce smo nato prestavili za 5 min v destilirano vodo pri 4°C. Sledilo je barvanje s Feulgen raztopino, 120 minut na sobni temperaturi. Preparate smo nato spirali v SO<sub>2</sub> vodi in sicer 3 krat po 2 minuti, 2 krat po 10 min in 1 krat 20 min. Na koncu smo preparate dehidrirali do ksilena in jih pokrili z vklopnim medijem DPX ter krovnimi stekelci.

### 3.2.2 Poltanke in ultratanke rezine

Tkiva so bila pripravljena po standardnem postopku priprave za TEM. Koščki tkiva so bili fiksirani v mešanici 0,5 % paraformaldehyda in 1,15 % glutaraldehyda v 0,05 M kakodilatnem pufru (pH 7,4), z osmolarnostjo 307 mOsmol/kg (3 ure, na 4°C) in postfiksirani v 2 % OsO<sub>4</sub> s ferocianidom (2 h in 30 min v temi pri sobni temperaturi). Za izpiralno tekočino je bil uporabljen 0,05 M kakodilatni pufer z 0,25 M saharoze. Po dehidraciji skozi rastočo etanolno vrsto so bila tkiva vklopljena v vklopni medij Spurr (ERL) in polimerizirana v sveže pripravljenem ERL pri 70 °C (čez noč).

Poltanke rezine smo rezali s steklenimi noži na ultramikrotomu Reichert Ultracut S na 0,5 µm debele rezine. Rezine smo nato polagali v kapljice MiliQ na polilizinskih stekelcih ter jih raztegnili na termoplošči pri temperaturi 85°C. Posušene rezine smo barvali z barvilom

Azur II Methylene blue in jih po petnajstih sekundah spirali z MiliQ destilirano vodo. Preparat smo nato ponovno postavali na termoploščo in posušili.

Ultratanke rezine, debeline od 70 do 80 nm smo rezali z diamantnim nožem Diatome ultra na ultramikrotomu Reichert Ultracut S. Rezine smo nato prenašali na bakrene mrežice (nosilci preparata).

Sledilo je kontrastiranje, saj so biološki preparati sicer slabo kontrastni. Kontrastirali smo z uranil acetatom (15 minut) in svinčevim citratom (10 minut) po postopkih Venable in Coggeshall (1965, cit v Bozzola in Russel, 1991).

### **3.2.3 Mikroskopiranje**

Poltanke in histološke preparate smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom OPTON - Axioskop Zeiss in jih fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500.

Ultratanke rezine smo pregledovali s presevnim elektronskim mikroskopom Philips CM 100 ter poslikali z digitalno kamero Gatan BioScan Model 792.

Fotografije parafinskih, poltankih in ultratankih rezin smo obdelali z računalniškim programom Adobe Photoshop CS 5. Preglednice vključene v diplomsko nalogu so bile oblikovane v Microsoft Wordu.

## 4 REZULTATI

### 4.1 MORFOLOGIJA OOGONIJEV

Oogoniji so večinoma v skupkih ali gnezdih v vezivnem tkivu robnega dela ovarija (sl. 2 a, b). Gnezda merijo od 60 do 150  $\mu\text{m}$ . V posameznem gnezdu smo prešteli od 2 do 30 oogonijev, ki so majhne, okrogle celice, velikosti od 17 do 50  $\mu\text{m}$ , z velikim jedrom. V steni ovarija so tudi posamezni oogoniji, obdani s somatskimi prefolikularimi celicami (sl. 2 c).

Plazmalema sosednjih oogonijev je na nekaterih mestih prekinjena in citoplazmi sosednjih oogonijev sta v stiku s citoplazmatskim mostičkom (sl. 3). Skupine oogonijev obdajajo prefolikularne celice (sl. 4). Njihova velika, temna, vretenasta jedra so na obrobju gnezda, ponekod pa tudi že med oogoniji, kjer se odrivki prefolikularnih celic vrivajo med sosednje oogonije (sl. 5). V jedru so vidna območja evkromatina in hetreokromatina (sl. 6). V prefolikularnih celicah so številni mitohondriji ter intermediarni filamenti. Citoplazma je elektronsko gosta (sl. 7 a, b). V citoplazmi so tudi posamezne maščobne kaplje, Golgijev aparat, ribosomi ter cisterne endoplazemskega retikuluma. Med sosednjimi prefolikularimi celicami so točkovne povezave ali dezmosomi, mestoma se sosednji plazmalemi zlivata (sl. 8 a, b).

Plazmelemi oogonija in sosednje prefolikularne celice sta večinoma v neposrednem stiku, mestoma so vidni ozki medcelični prostor ter dezmosomom podobne zgostitve (sl. 9 a, b). Ponekod je opazno nagubanje ooleme in plazmaleme sosednje prefolikularne celice (sl. 10), mikrovilov značilnih za zrelejše faze razvoja še ni zaslediti.

Jedro oogonija meri okrog 20  $\mu\text{m}$  in zavzema večino prostornine celice. Jedrca (sl. 11) so maloštevilna, večinoma dva do štiri. Jedrni ovoj z vmesnim perinuklearnim prostorom in jedrnimi porami je gladek (sl. 12). Jedra oogonijev so v različnih fazah mitotske delitve, najpogosteje smo zasledili interfazna jedra, ki so sferične oblike (sl. 13 a, b), prevladuje evkromatin, elektronsko svetlejša, nezgoščena oblika kromatina, na nekaterih mestih pa so

jasno vidni heterokromatinski skupki, koncentrirani predvsem ob jedrni ovojnici (sl. 13 b, c). V jedru je viden nitast (filamentozni) material nizke elektronske gostote, interkromatinske granule ter posamezne, večje perikromatinske granule (sl. 13 c).

V profazi mitotske delitve so v jedru vidne zgostitve (sl. 14), saj se kromosomi začno spiralizirati. Jедrca v pozni profazi postopoma izginejo. V anafazi opazimo kromosome, ki potujejo na nasprotna pola celice (sl. 15). Telofazna jedra (sl. 16 a, b) so nepravilnih oblik, lahko so režnjasta, kar zavisi od prereza preparata. Jедrca se v tej fazi ponovno formirajo.

Citoplazma oogonija je svetla, elektronsko redka. V njej še ni izoblikovanega membranskega sistema značilnega za oocite. Opazni so kanali in le posamezne cisterne endoplazemskega retikuluma, ki so ozke, mestoma razširjene in kratke (sl. 17 a, c). Ponavadi je več cistern na periferiji celice. Cisterne so večinoma gladke, brez ribosomov, vendar smo mestoma opazili tudi zrnati endoplazemski retikulum z ribosomi (sl. 17 c).

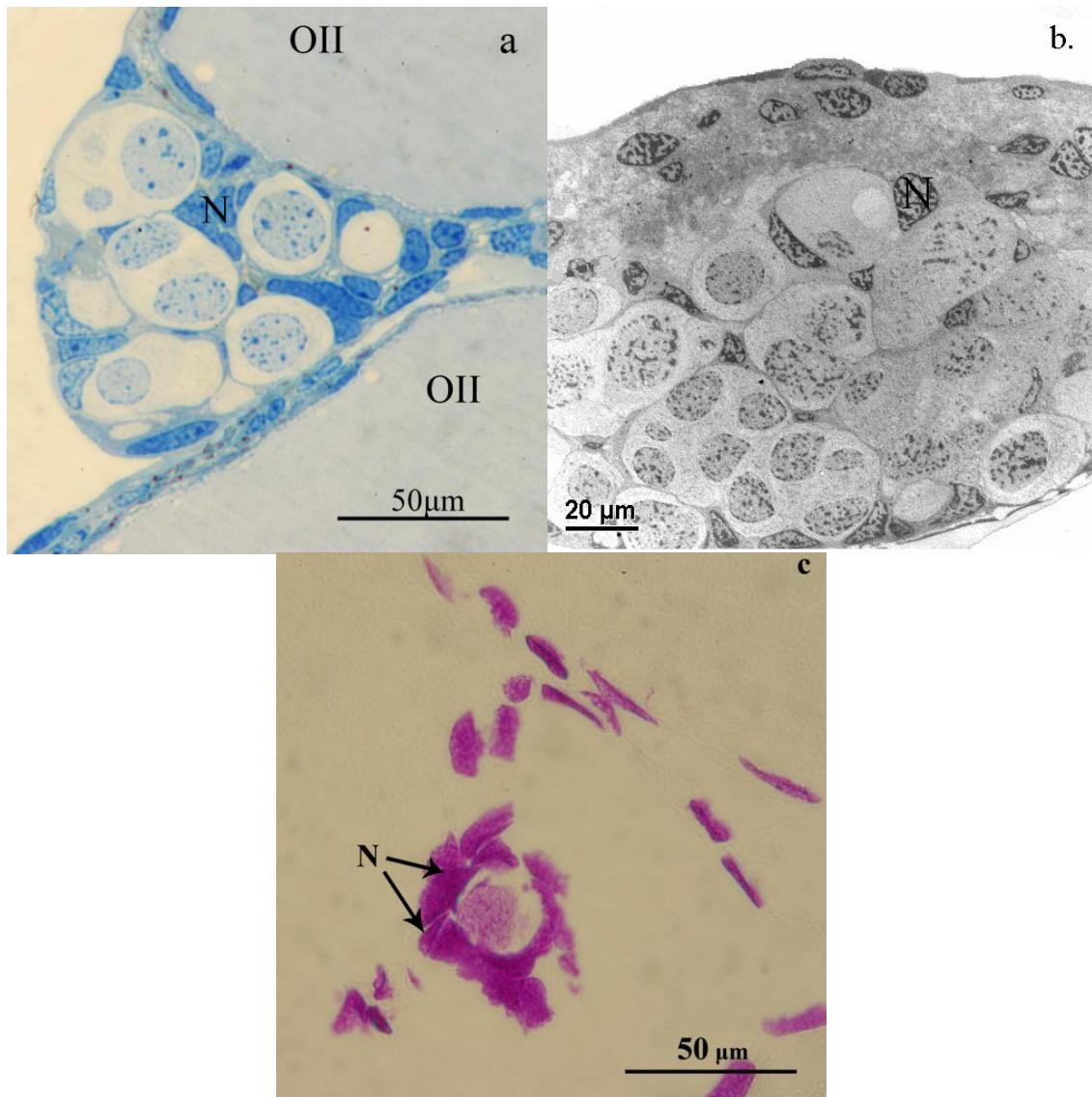
V citoplazmi so številni mitohondriji z raznoliko morfologijo. Mitohondriji so bodisi okrogle ali podolgovate oblike z izrazitimi kristami in ponekod vidnimi mitohondrijskimi zrni (sl. 18 a,d). Kriste so lahko lamelarne (sl. 18 b), vezikularne ali tubularne (sl. 18 d). Pogosti so tudi M z izrazitimi bočnimi razširtvami (sl. 18. c). Matriks je večinoma elektronsko gost, zasledimo pa tudi mitohondrije z elektronsko svetlim matriksom in redkimi kristami (sl. 19).

Glikogenske granule so neenakomerno razporejene v citoplazmi (sl. 18 a). Lipidne kaplje so večinoma v skupini na enem polu oogonija (sl. 20 a). So različnih velikosti, pravilnih, okroglih oblik, z elektronsko gosto sredico, svetlejšim robom in elektronsko gostim plaščem (sl. 20 c). V njihovi bližini so vedno tudi mitohondriji (sl. 20 b). V nekaterih oogonijih smo poleg okroglih lipidnih kapelj istočasno zasledili tudi lipidne kaplje izrazito nepravilnih oblik (sl. 20 d).

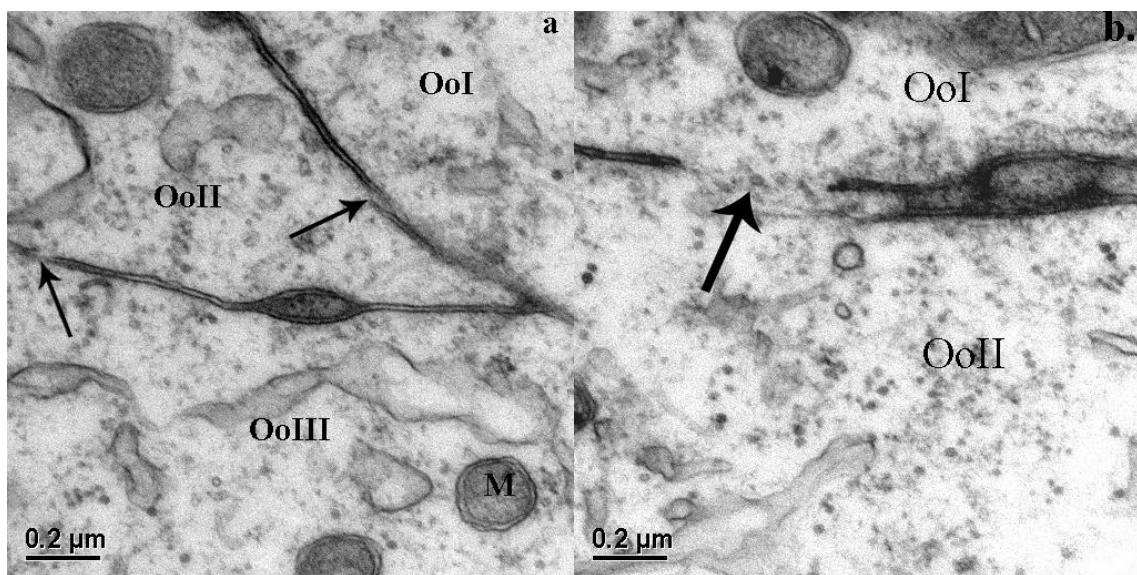
V citoplazmi so pogosti skupki elektronsko gostih teles z vlknasto vsebino in vezikli z elektronsko svetlo, homogeno vsebino (sl. 21 a, b).

V citoplazmi je več kompleksov (do pet) Golgičevega aparata, ki ga sestavljajo sploščene membranske cisterne ter vezikli na konkavni trans strani (sl. 22). Vezikli imajo homogeno,

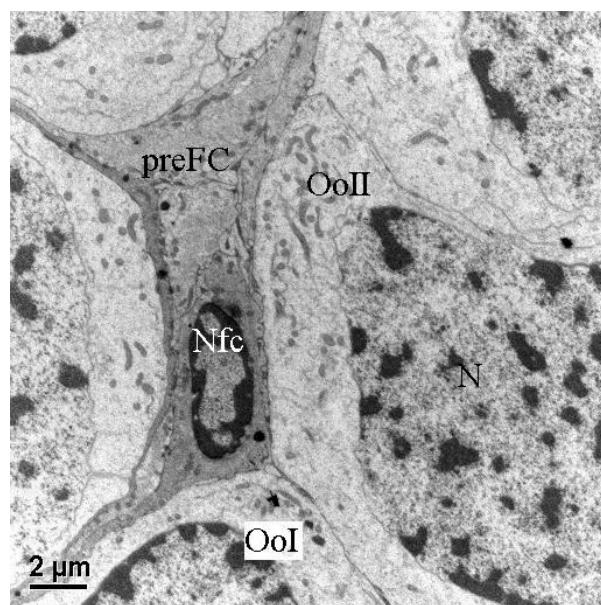
elektronsko svetlo vsebino, v bližini so kratke, razširjene cisterne ER, katerih vsebina je elektronsko gostejša.



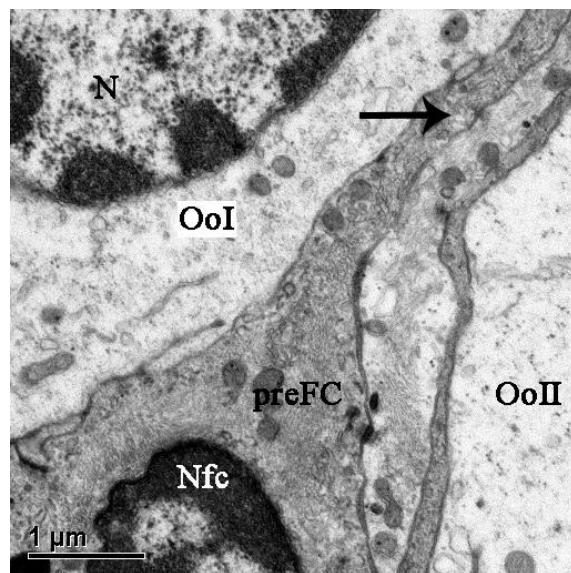
Slika 2 a, b, c. Oogoniji v steni ovarija močerila *P. anguinus anguinus*. OII –oocita druge zoritvene faze. N - jedra prefolikularnih celic. a. Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue. b. TEM posnetek. c. Parafinska rezina. Barvanje po Feulgenu.



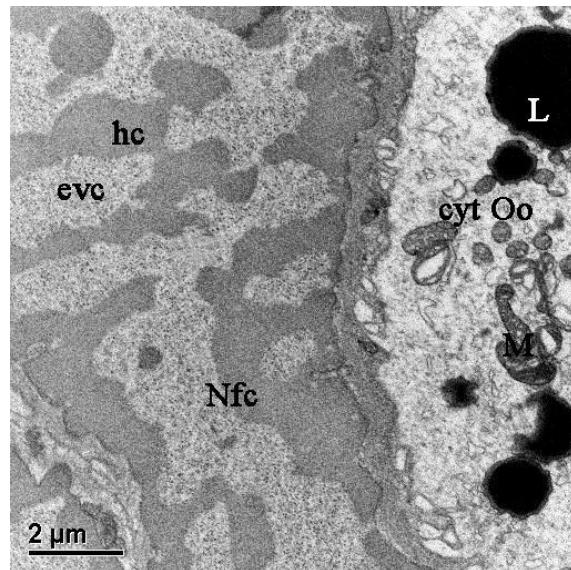
Slika 3 a, b. Citoplazemski mostiček (puščice), mesto neposrednega stika dveh sosednjih oogonijev (OoI, OoII, OoIII). M - mitohondrij. TEM posneteka.



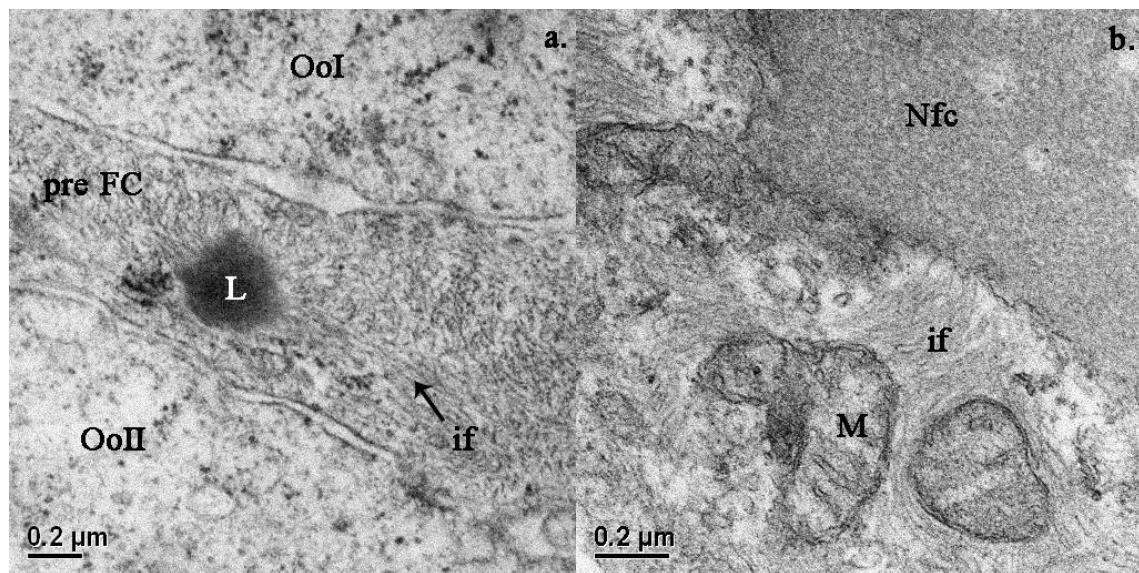
Slika 4. Prefolikularna celica (preFC) z značilnim heterokromatskim, vretenastim jedrom (Nfc) in oogoniji, ki mejijo nanjo. OoI-V – oogonij, ki mejijo na prefolikularno celico. N - jedro oogonija. TEM posnetek.



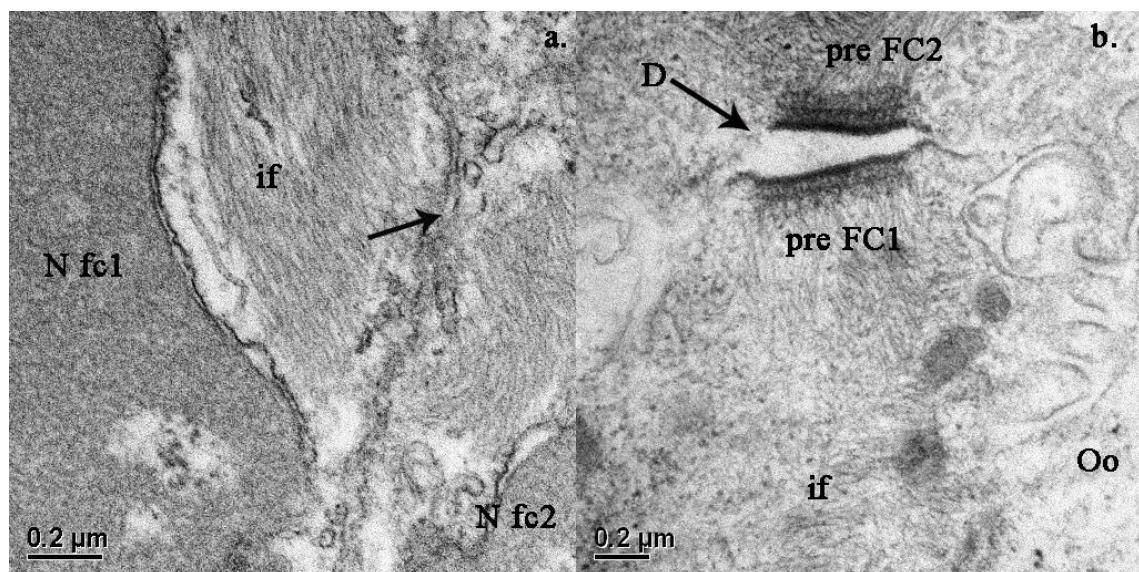
Slika 5. Odstavek prefolikularne celice (puščica) med sosednja oogonijema (OoI, OoII). N – jedro oogonija. Nfc – jedro prefolikularne celice. TEM posnetek.



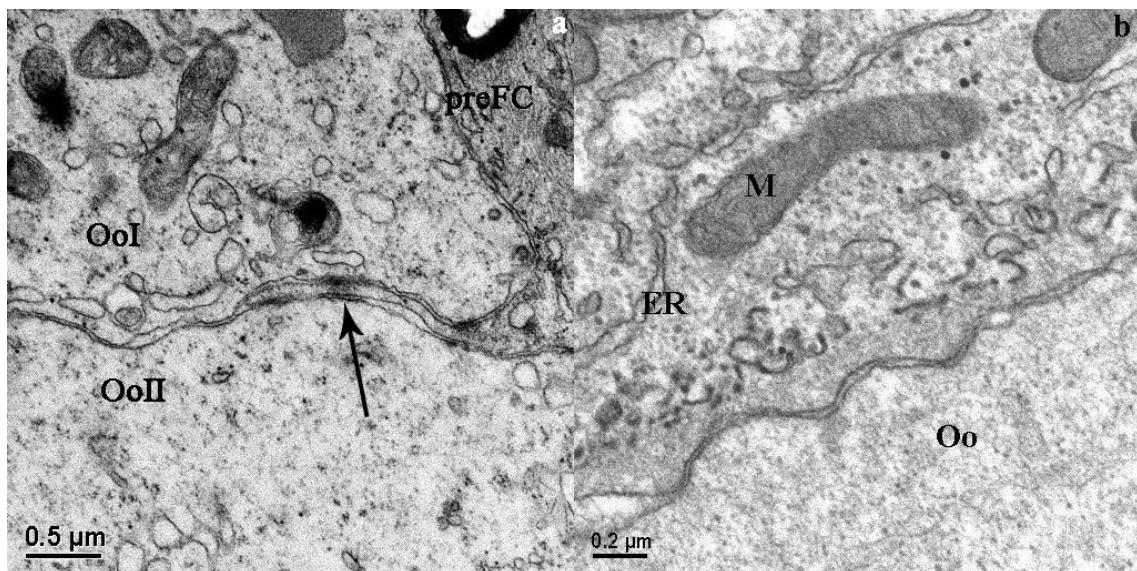
Slika 6. Jedro prefolikularne celice (Nfc) z območji evkromatina (evk) in heterokromatina (hc). cyt Oo – citoplazma oogonija. M – mitohondriji. L- lipidne kaplje. TEM posnetek.



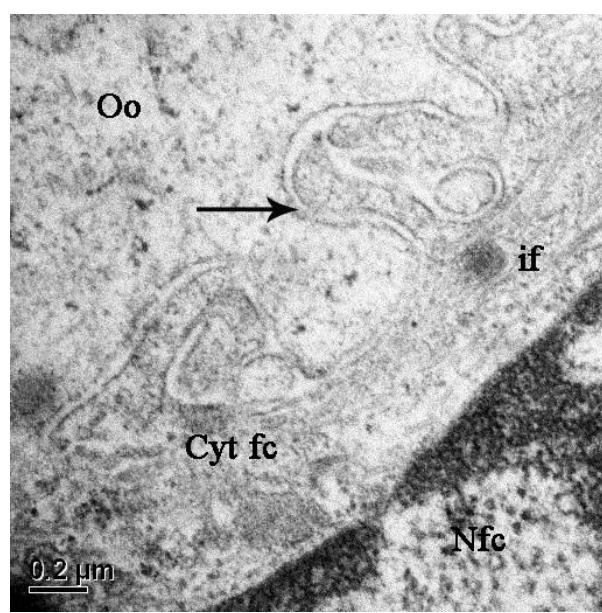
Slika 7 a, b. Citoplazma prefolikularnih celic (preFC) z številnimi intermediarnimi filamenti (if). V prefolikularnih celicah so posamezne maščobne kaplje (L) (slika a) in mitohondriji (M) (slika b). Nfc – jedro prefolikularne celice, OoI, II - oogonija. TEM posnetka.



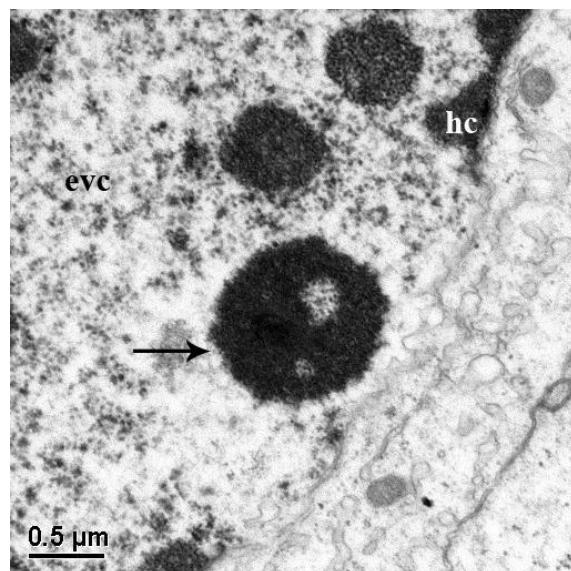
Slika 8 a, b. Medcelični stiki sosednjih prefolikularnih celic. a. Neposreden stik plazmalem sosednjih prefolikularnih celic (puščica). Nfc1, Nfc2 – jedri prefolikularnih celic. b. Dezmosom (D) med prefolikularnima celicama (pre FC1, pre FC2). Oo – oogonij. if – intermediarni filamenti. TEM posnetka.



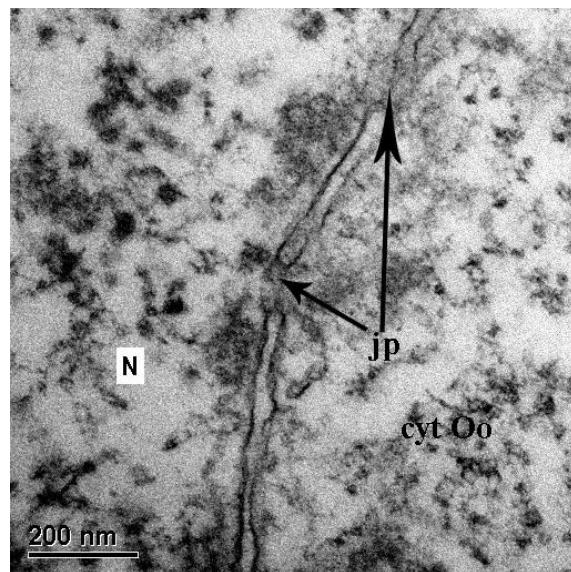
Slika 9 a, b. Stik oogonija s prefolikularno celico. Dezmosomom podobne zgostitve (puščica) med oogonijema (OoI, OoII) in odrivkom prefolikularne celice (preFC) (slika a). TEM posnetka.



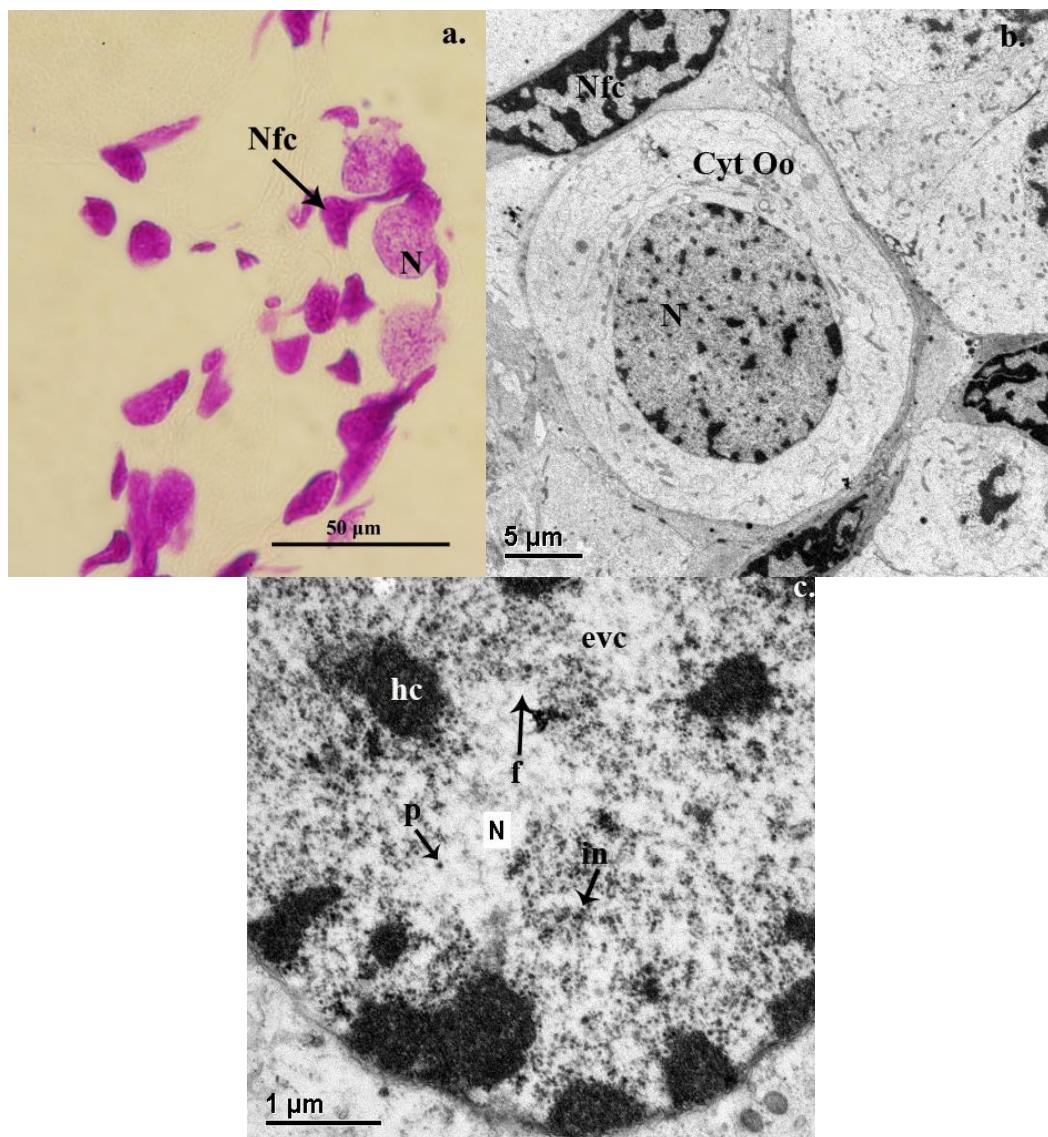
Slika 10. Nagubanje sosednjih plazmalem na stiku oogonija (Oo) s prefolikularno celico. Puščica – olema. Cyt fc – citoplazma prefolikularne celice. Nfc – jedro prefolikularne celice. if – intermediarni filamenti. TEM posnetek.



Slika 11. Jедрце оогонија (пуščica). evc – evkromatin. hc – heterokromatin. TEM posnetek.



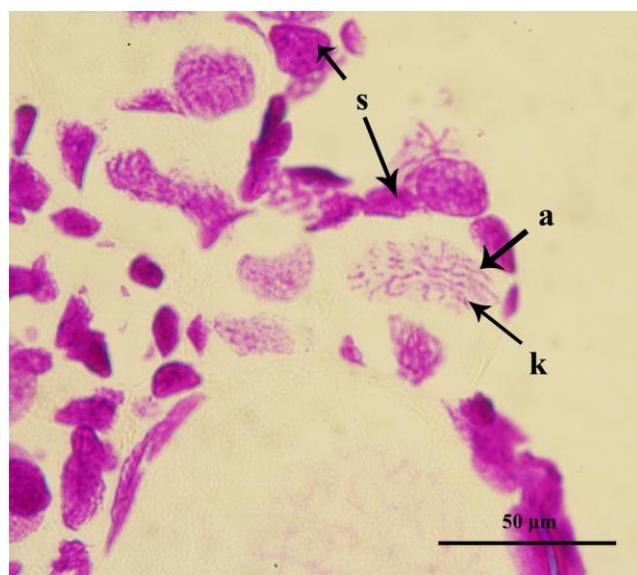
Slika 12. Jедрни овој з једрними порами (jp). N – једро оогонија. cyt Oo – цитоплазма оогонија. TEM posnetek.



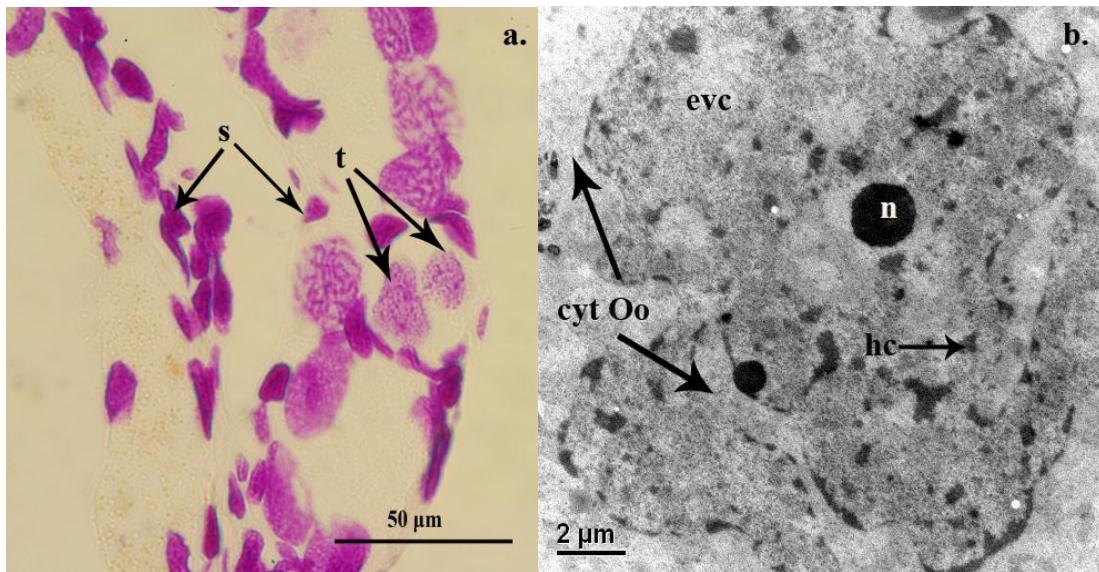
Slika 13 a, b, c. Interfazno jedro oogonija (N) je okroglo in evkromatsko. Cyt Oo – citoplazma oogonija. Nfc – jedro prefolikularne celice. c. Ločimo med nitastim (filamentoznim) materialom nizke gostote (f), interkromatinskimi granulami (in) ter posameznimi, večjimi perikromatinskimi granulami (p). a. Barvanje po Feulgenu. b - c. TEM posneteka.



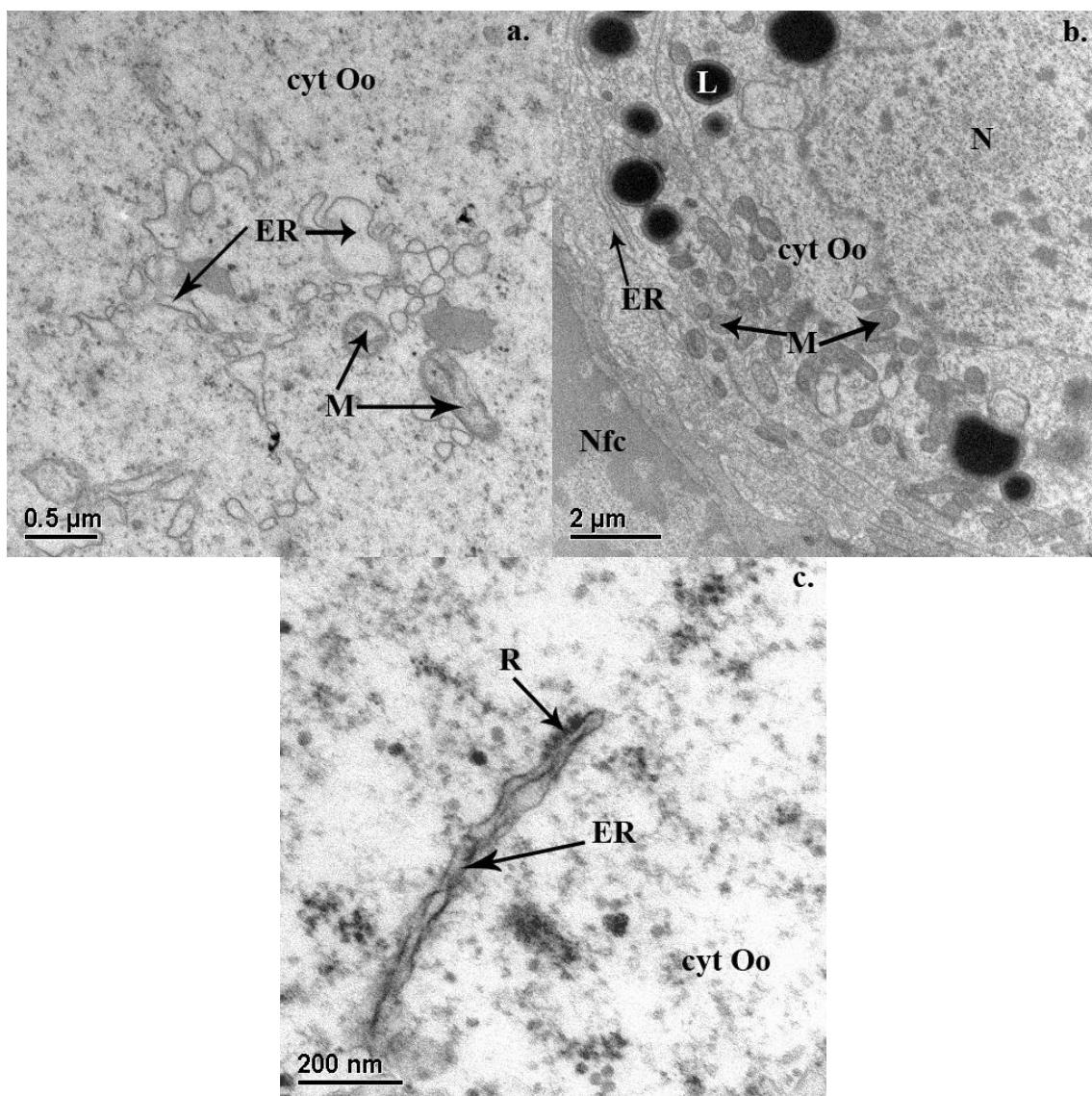
Slika 14. Profazna jedra oogonijev z zgostitvami zaradi spiraliziranih kromosomov. s - jedra somatskih celic. Barvanje po Feulgenu.



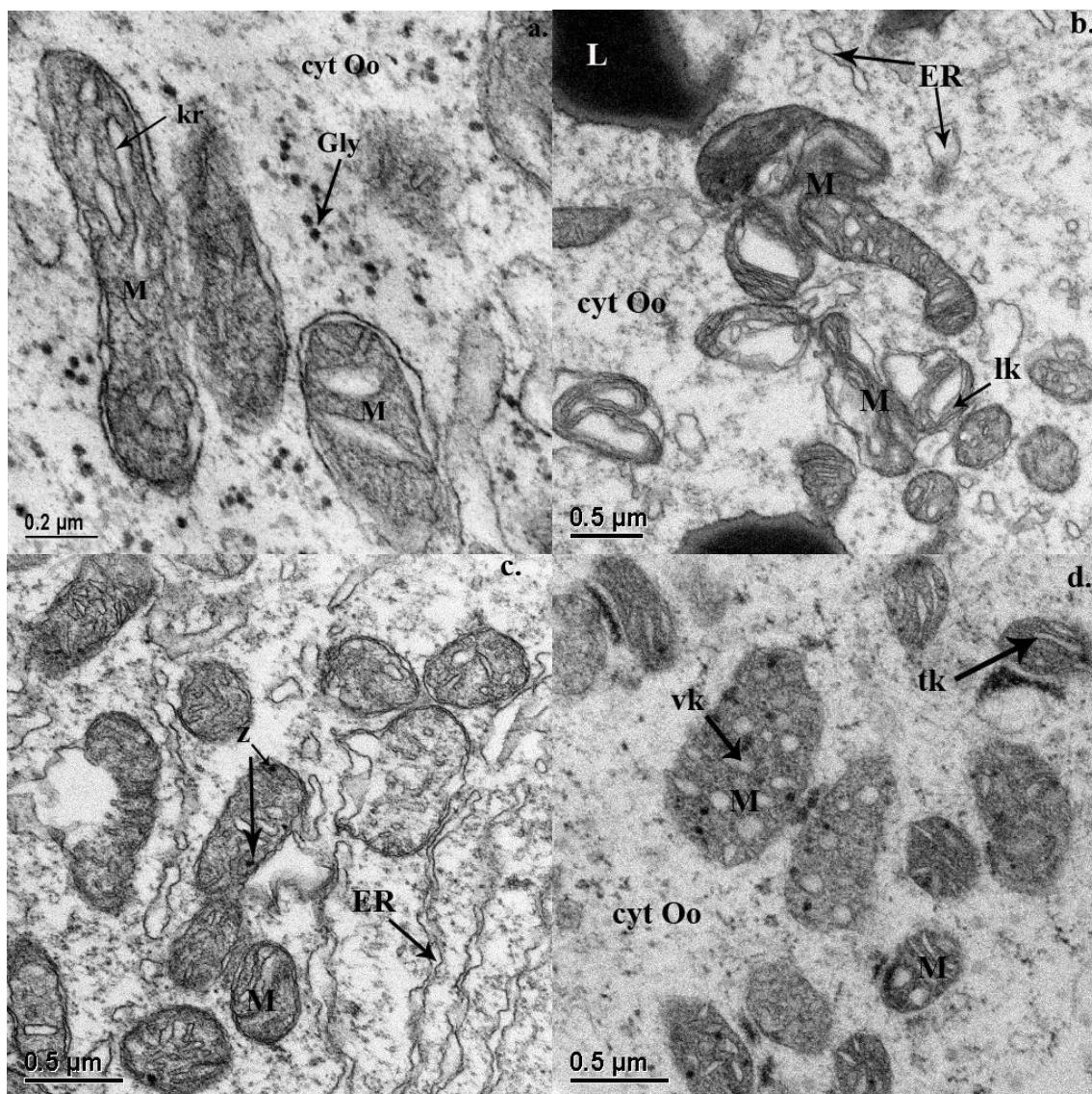
Slika 15. Jedro oogonija v anafazi. V anafaznem jedru (a) opazimo kromosome (k), ki potujejo na nasprotna pola celice. s – jedra somatskih celic. Barvanje po Feulgenu.



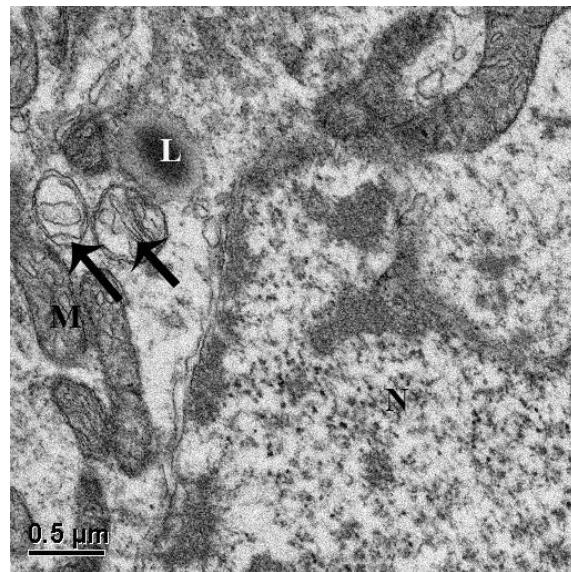
Slika 16 a, b. Jedro oogonija v telofazi. Telofazno jedro (t) je nepravilne oblike s ponovno formiranim jedrcem (n). Med posamezne režnje jedra se vriva citoplazma (cyt Oo). evc – evkromatin. hc – heterokromatin. s – jedra somatskih celic. a. Barvanje po Feulgenu. b. TEM posnetek.



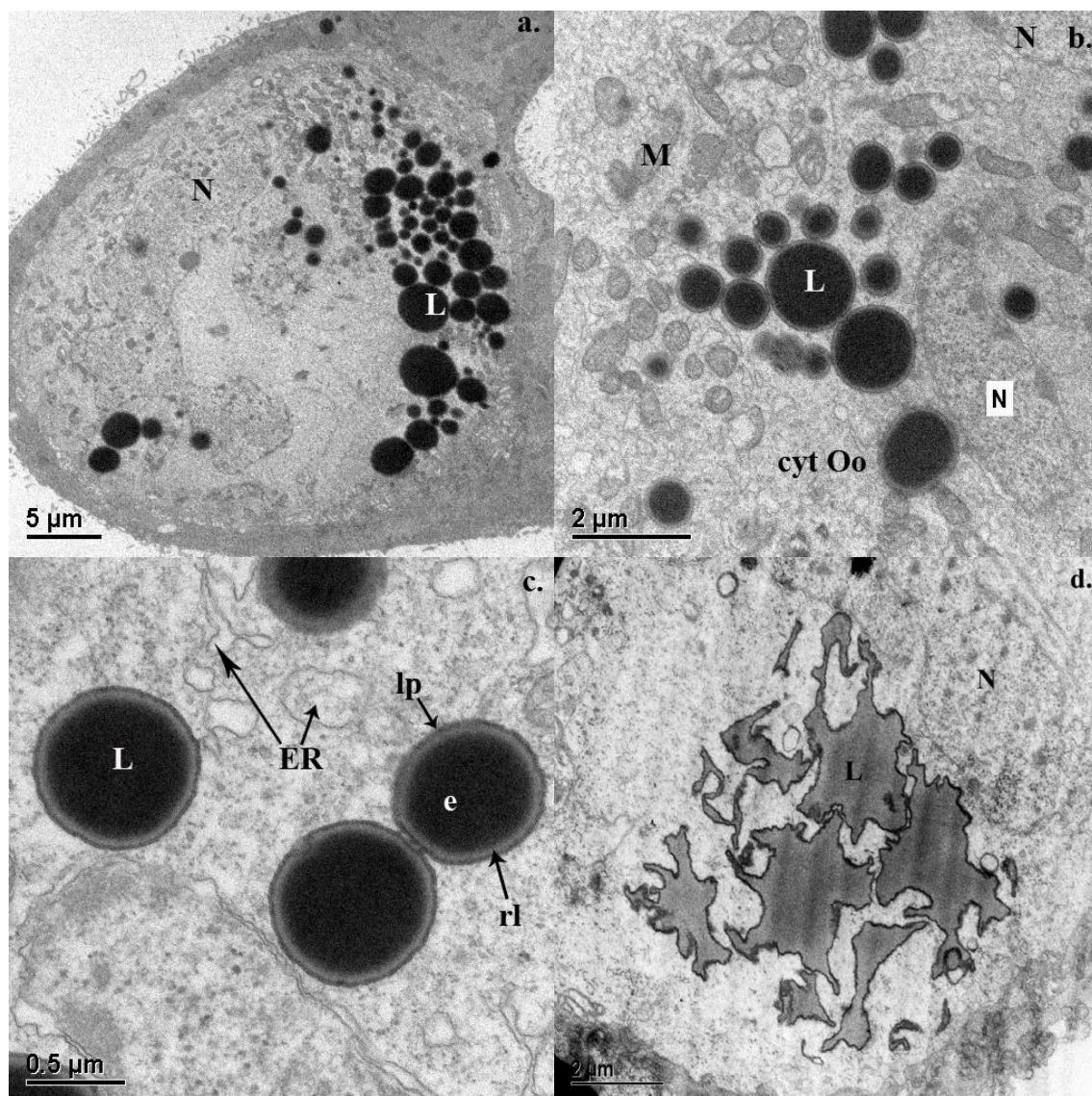
Slika 17 a, b, c. Endoplazemski retikulom v citoplazmi oogonija (cyt Oo). Cisterne endoplazemskega retikuluma (ER) so posamezne, lahko so kratke in razširjene (slika a) ali ozke (slika b, slika c). Mestoma so na cisternah ER vidni ribosomi (R). Več cistern je na robnem delu celice (slika b). Nfc – jedro prefolikularne celice. M – mitohondriji. L- lipidne kaplje. N – jedro oogonija. TEM posnetki.



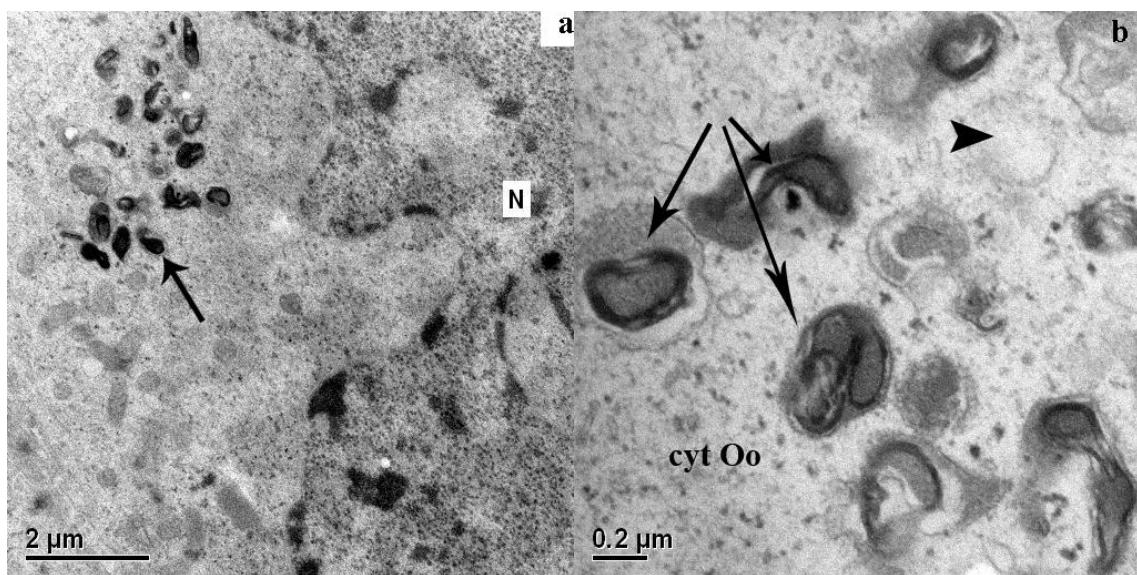
Slika 18 a, b, c, d. Mitohondriji v citoplazmi oogonijev. Mitohondriji (M) so okrogle ali podolgovate oblike z izrazitim prečnim ali vzdolžnim kristami (kr) (slika a). Kriste so lahko lamelarne (lk) (slika b), vezikularne (vk) ali tubularne (tk) (slika d). Pogosti so M z bočnimi deformacijami (slika c). z - zrna v matriksu. cyt Oo - citoplazma oogonija. ER - endoplazemski retikulum. L - lipidna kaplja. Na sliki a je viden glikogen (Gly). TEM posnetki.



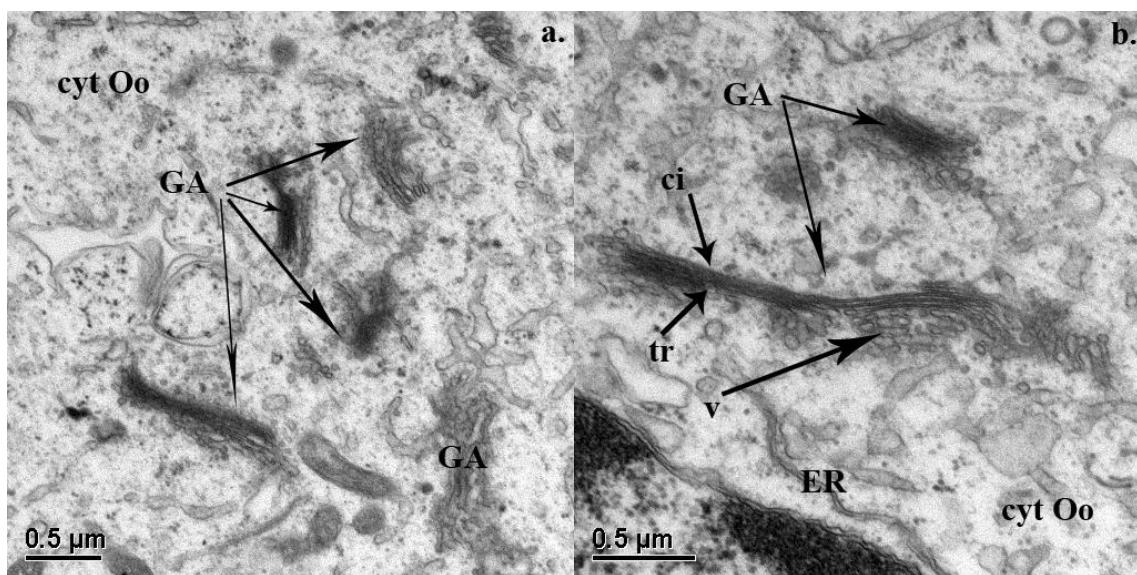
Slika 19. Mitohondriji z elektronsko svetlim matriksom in maloštevilnimi kristami (puščici). L – lipidne kaplje. M – mitohondriji z elektronsko gostim matriksom. N – jedro oogonija. TEM posnetek.



Slika 20 a, b, c, d. Lipidne kaplje v citoplazmi oogonijev. a. Lipidne kaplje (L) so običajno v skupini na enem polu oogonija. b. V njihovi bližini so mitohondriji (M). c. Lipidne kaplje z elektronsko gosto sredico (e), svetlejšim robom (rl) in elektronsko gostim plaščem (lp). ER – razširjene cisterne endoplazemskega retikuluma. d. Lipidne kaplje nepravilnih oblik (L). Cyt Oo – citoplazma oogonija. N – jedro oogonija v telofazi. TEM posnetki.



Slika 21 a, b. Elektronsko gosta telesa (puščice) in vezikli z elektronsko svetlejšo, homogeno vsebino (glava puščice) v citoplazmi oogonija (cyt Oo). TEM posnetek.



Slika 22 a, b. Skupki ali kompleksi Golgijevega aparata (GA) v citoplazmi oogonijev (cyt Oo). Sestavlja ga sploščene membranske cisterne ter vezikli (v) na konkavni trans strani (tr). ci – cis stran Golgijevega aparata. ER – endoplazemski retikulum. TEM posnetka.

## 4.2 MORFOLOGIJA ZGODNJIH PREVITELOGENIH OOCIT

### 4.2.1 Ocite I

Ocite I so velike od 100 do 300  $\mu\text{m}$  in imajo ob jedru značilno lipidno maso iz lipidov in mitohondrijev (sl. 23 a, b). Jedro je veliko, v središču oocite in z večjim številom manjših jedrc. Jedrca imajo značilno zgradbo, kot pri oogonijih (sl. 24). Jedrne pore so številčnejše. Nukleoplazma je na videz podobna citoplazmi ob jedru (sl. 25). V jedrih so vidne kromatinske niti (sl. 26), značilne za pahiten fazo prve mejotske delitve.

Citoplazma je gostejša kot pri oogonijih, z značilnim razvejanim membranskim sistemom (sl. 27 a, b, c). Na cisternah endoplazemskega retikuluma ni vidnih ribosomov. Ponekod so cisterne membranskega sistema naložene tesno ena na drugo (sl. 27 c). V citoplazmi so številni ribosomi in poliribosomi. Skladno z večanjem celice se povečuje tudi število citoplazemskih organelov, slednji so številčnejši kot pri oogonijih.

Mitohondriji so najštevilčnejši v lipidni masi ob jedru, a so številni tudi v preostali citoplazmi. Lahko so okrogli ali podolgovati, večinoma z elektronsko gostim matriksom in tubularnimi kristami ter posameznimi mitohondrijskimi zrni. (sl. 28). Mitohondrijev z značilno bočno razširitvijo pri oocitah nismo zasledili.

Lipidne kaplje so številnejše kot pri oogonijih, imajo pa ravno tako elektronsko gosto sredico, svetlejši rob in elektronsko gost plič (sl. 29 a). Koncentrirane so ob jedru, ponekod jedro obdajajo z vseh strani (sl. 29 b), ali pa so lipidi zgoščeni na enem mestu bodisi v mitohondrijski masi ali v manjših skupkih. Poleg najpogostejev okroglih lipidnih kapelj smo zasledili tudi lipidne kaplje nepravilnih oblik (sl. 29 c).

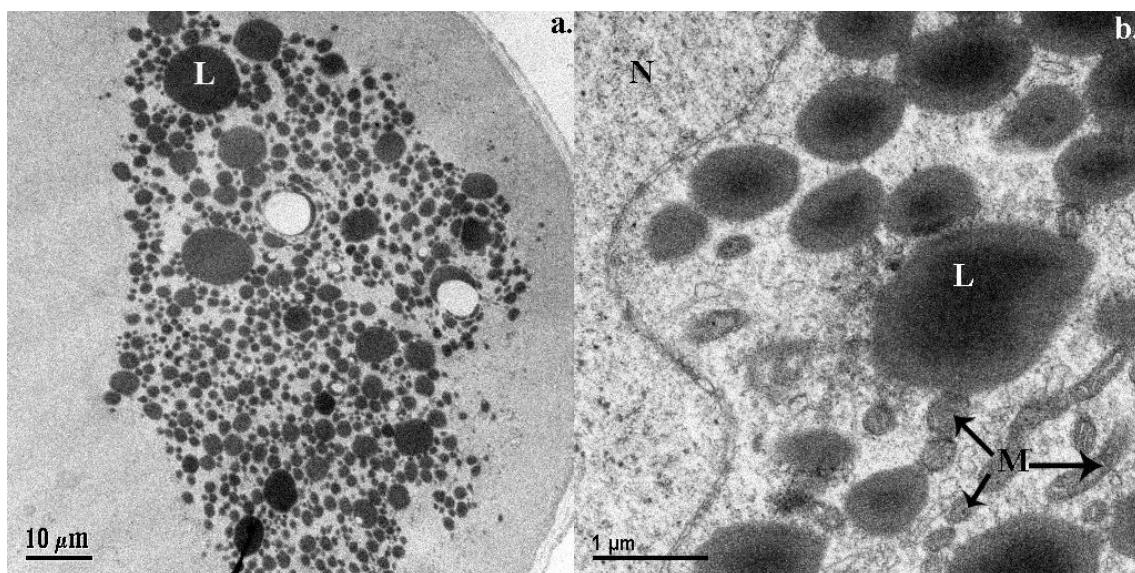
V citoplazmi je tudi več kompleksov Golgijskega aparata (sl. 30) s številnimi vezikli na trans strani.

Pogosta so mielinska telesa, sestavljena iz zblizanih, koncentrično naloženih membran (sl. 31).

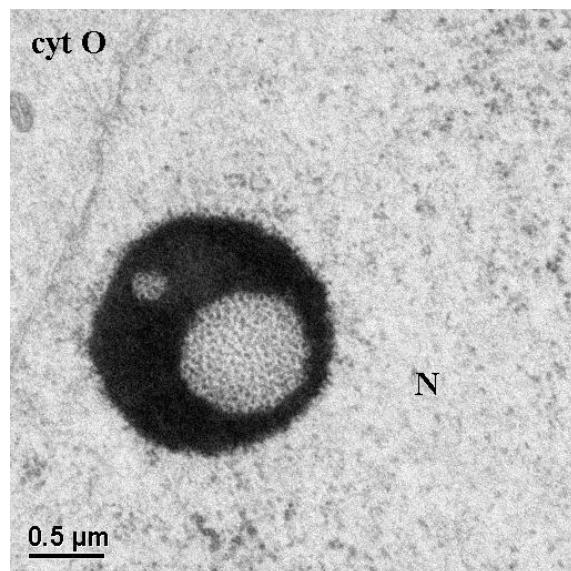
V citoplazmi najdemo tudi različne vezikle od 0,5 do 1,5  $\mu\text{m}$  v premeru, s homogeno zrnato vsebino ali pa z različno, heterogeno vsebino (sl. 32 a, b).

Plazmalemi oocite in sosednjih folikularnih celic sta na mnogih mestih še vedno v neposrednem stiku, z rastjo pa se vedno pogosteje pojavlajo izrastki ooleme, mikrovili, ki so številčnejši in daljši. Izrastke ali makrovile tvorijo tudi folikularne celice (sl. 33), ti so vedno večji in številčnejši. Na ta način se veča stična in posledično tudi izmenjevalna površina med jajčno celico in folikularnimi celicami (sl. 34 a, b). Na stiku oocite I s folikularno celico je ponekod opazna izrazita zgostitev citoplazme (sl. 35).

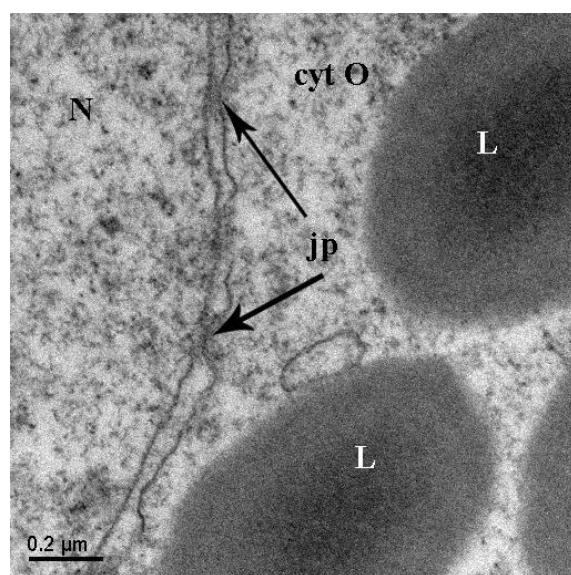
Folikularne celice se med seboj stikajo z dezmosomi ali neposredno s plazmalemo (sl. 36 a, b). V citoplazmi folikularnih celic je veliko mitohondrijev, cistern membranskega sistema in intermediarnih filamentov (sl. 37 a, b). Občasno so vidni tudi lizosomi (sl. 38).



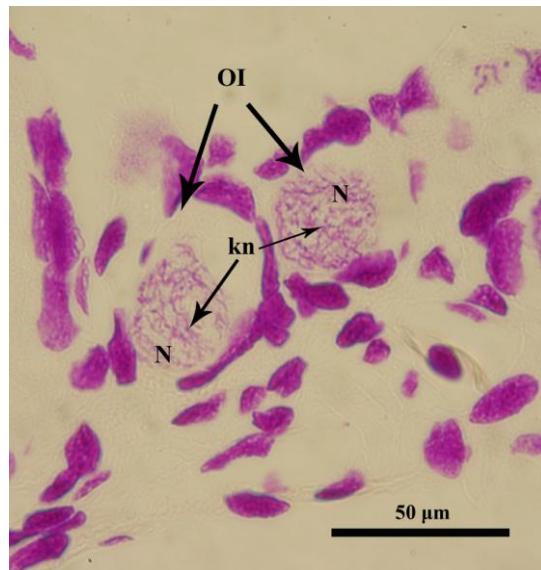
Slika 23 a, b. Skupek lipidnih kapelj (L) ob jedru oocite I. N - jedro. M - mitohondriji.  
TEM posnetka.



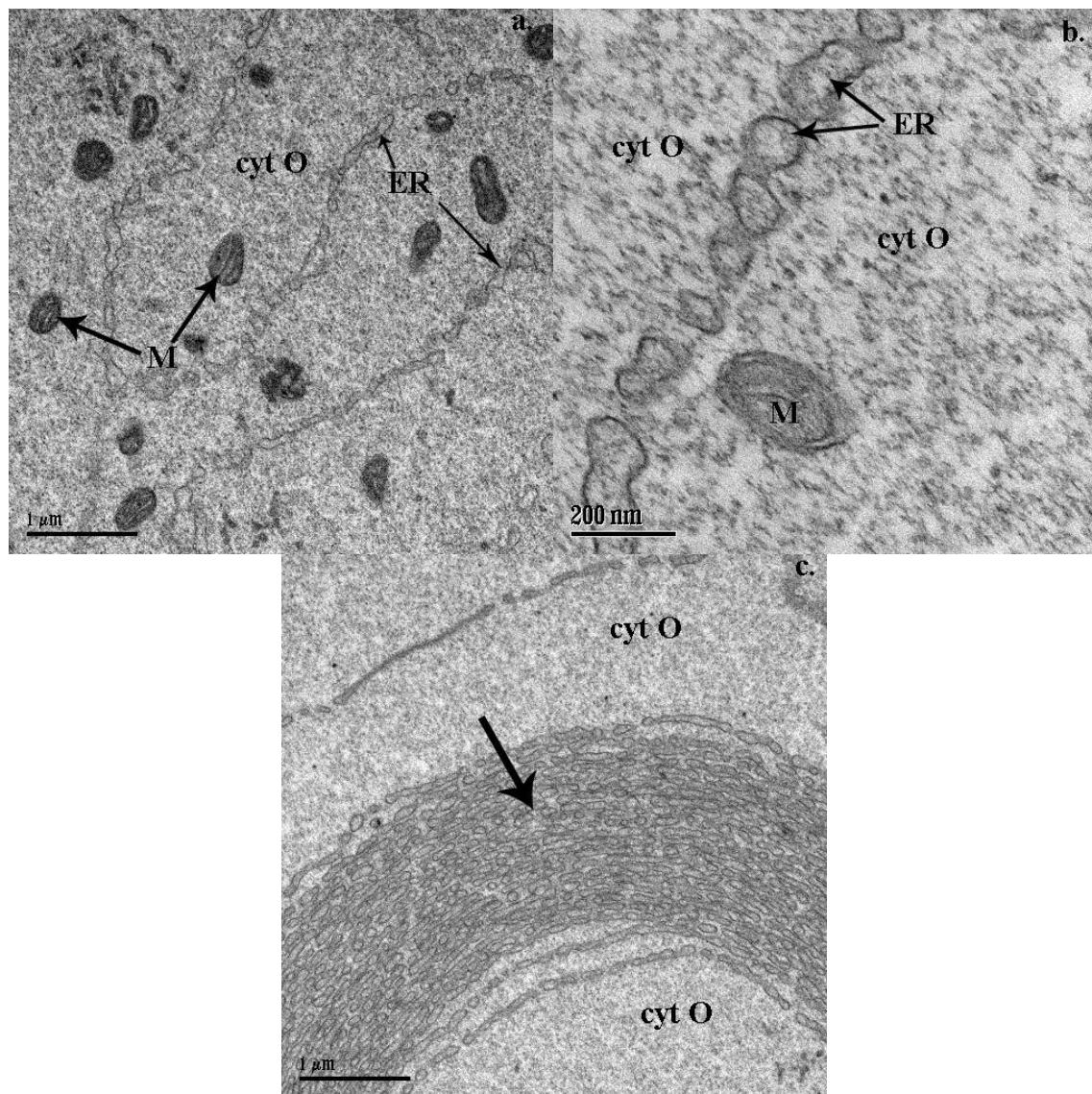
Slika 24. Jедрце ооците I. cyt O – цитоплазма ооците. N – једро ооците. TEM posnetek.



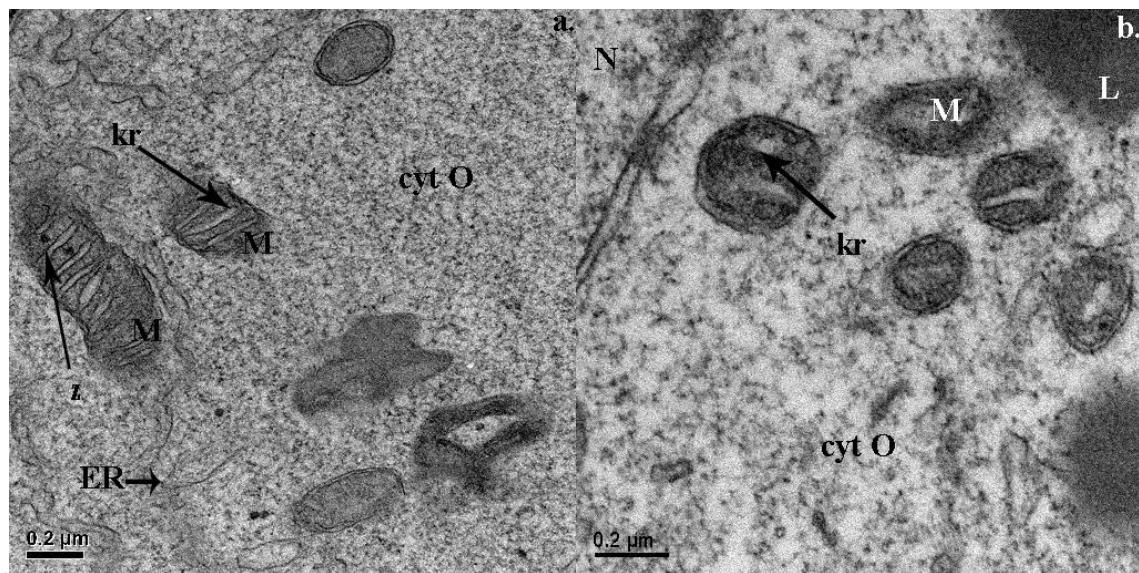
Slika 25. Jедрна мембрана, нуклеоплазма и цитоплазма об једру. Једрна мембрана има већ једрних пор (jp). Нуклеоплазма (N) је на видеу подобна цитоплазми об једру (cyt O). L – липидна капља. TEM posnetek.



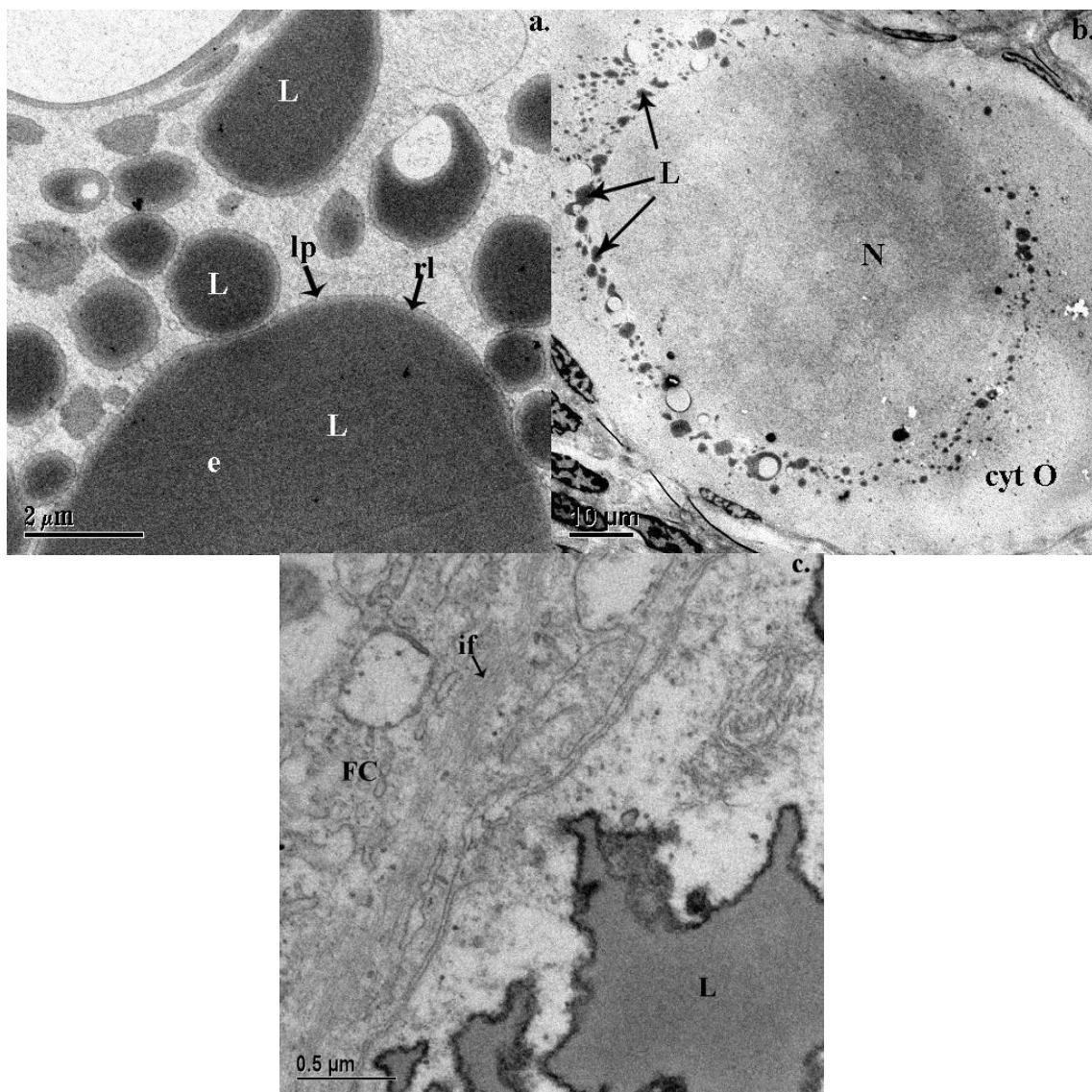
Slika 26. Kromosomske niti (kn) v jedru oocite I (OI). N - jedro. Barvanje po Feulgenu.



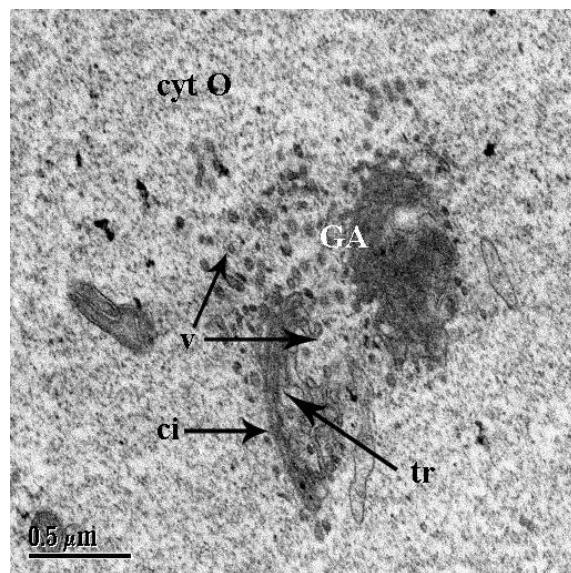
Slika 27 a, b, c. Membranski sistem v citoplazmi oocite I. Citoplazma (cyt O) je gostejša kot pri oogonijih. Ooplazma vsebuje razvejan membranski sistem (ER). Cisterne so na nekaterih mestih gosto naložene (puščica) (slika c). M - mitohondrij. TEM posnetki.



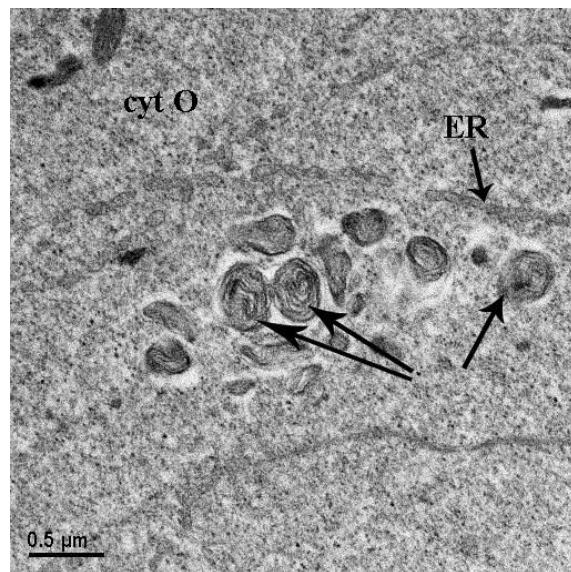
Slika 28 a, b. Mitochondriji (M) v citoplazmi oocite I (cyt O) z izrazitimi kristami (kr). ER – endoplazemski retikulum. L – lipidna kaplja. z - mitohondrijska zrna. N - jedro. TEM posnetka.



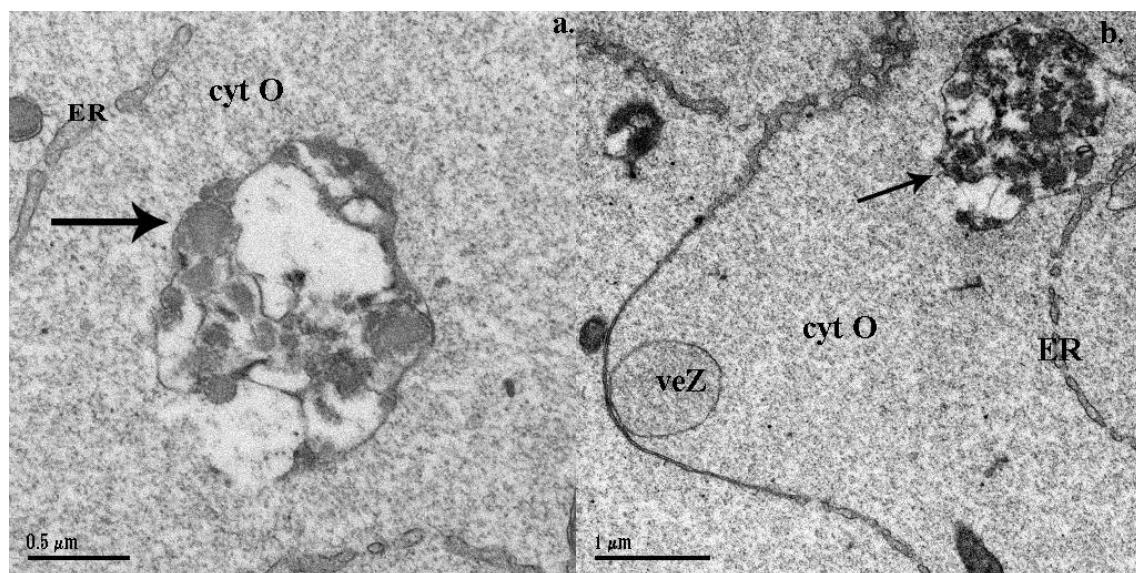
Slika 29 a, b, c. Lipidne kaplje v oociti I. **a.** Lipidne kaplje (L) imajo značilno zgradbo: elektronsko gosto sredico (e), svetlejši rob (rl) in elektronsko gost plič (lp) **b.** Lipidne kaplje (L) popolnoma obdajajo jedro (N) oocite. cyt O – citoplazma oocite. **c.** Lipidne kaplje (L) so lahko nepravilnih oblik. FC – folikularna celica. if – intermediarni filamenti. TEM posnetki.



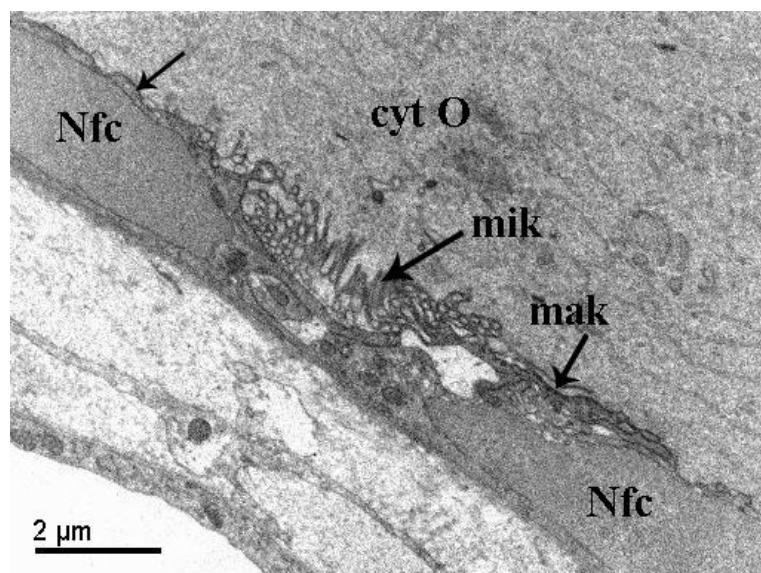
Slika 30. Golgijev aparat (GA) v citoplazmi oocite I (cyt O). Sestavlja ga maloštevilne, sploščene membranske cisterne ter številni drobni vezikli (v). ci – cis stran Golgijevega aparata. tr – trans stran. TEM posnetek.



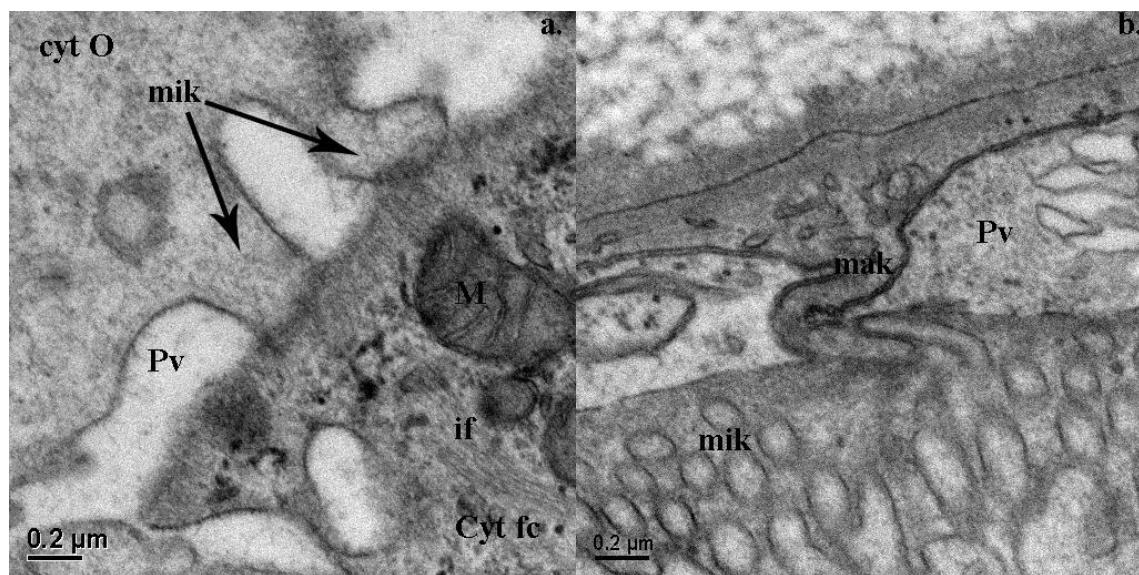
Slika 31. Mielinska telesa (puščice) v citoplazmi oocite I (cyt O). ER – endoplazemski retikulum. TEM posnetek.



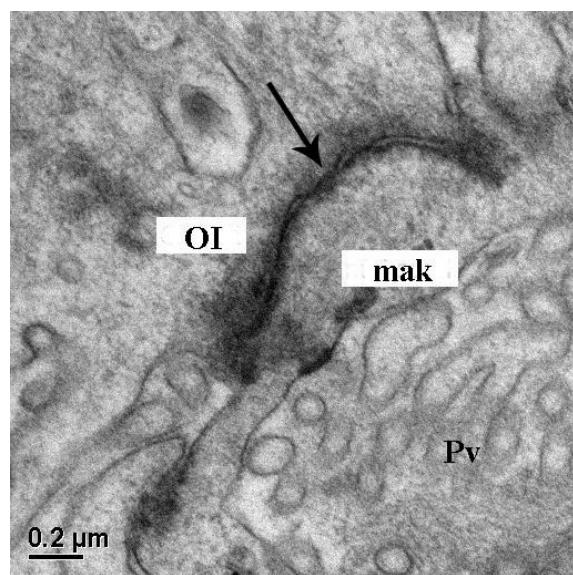
Slika 32 a, b. Vezikli v citoplazmi oocite I. V citoplazmi oocite (cyt O) so vezikli (puščica) s heterogeno vsebino, kot tudi manjši vezikli z srednje elektronsko gosto, zrnato vsebino (veZ) (slika b). ER – cisterne membranskega sistema. TEM posnetka.



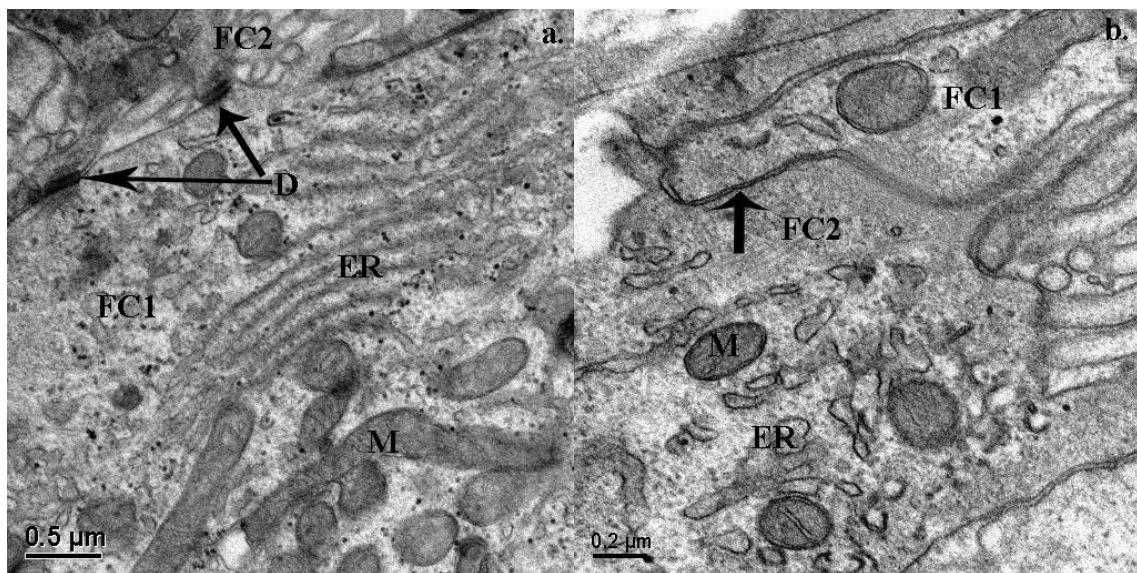
Slika 33. Stik oocite s folikularno celico. Plazmalemi oocite in sosednjih folikularnih celic sta na mnogih mestih še vedno v neposrednem stiku (puščica), oblikovani pa so že tudi mikrovili oocite (mik) in makrovili folikularnih celic (mak). Nfc – jedra folikularnih celic. cyt O – citoplazma oocite. TEM posnetek.



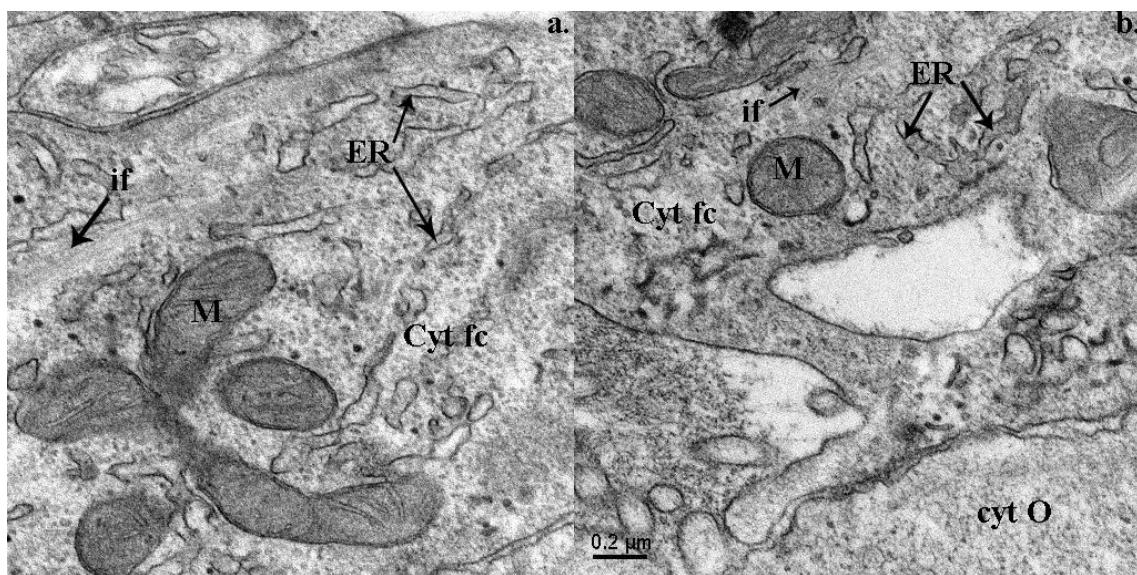
Slika 34 a, b. Mikrovili in makrovili. Izrasti ooleme, mirovili (mik) in izrasti folikularnih celic, makrovili (mak) povečujejo stično površino med celicama. Cyt O – citoplazma oocite. Cyt fc – citoplazma folikularne celice. M – mitohondriji. if – intermediarni filamenti. Pv – perivitelinski prostor. TEM posnetka.



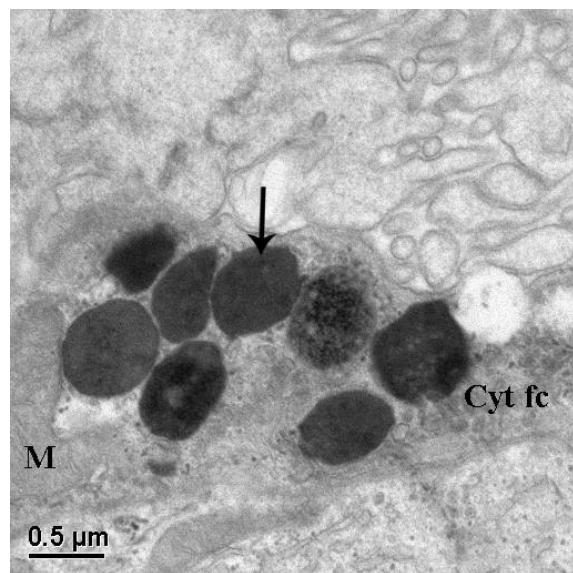
Slika 35. Stičišče folikularne celice z oocito I (OI). Na stiku je ponekod opazna zgodstitev citoplazme (puščica). mak – makrovil. Pv - perivitelinski prostor z mikrovili. TEM posnetek.



Slika 36 a, b. Stiki med folikularnimi celicami. Sosednji folikularni celici (FC1, FC2) se stikata z dezmosomi (D) (slika a). Ponekod prihaja do neposrednega stika sosednjih plazmalem (puščica) (slika b). M – mitohondrij. ER – cisterne membranskega sistema. TEM posnetka.



Slika 37 a, b. Citoplazma folikularnih celic (Cyt fc) z mitohondriji (M), cisternami membranskega sistema (ER) ter intermediarnimi filamenti (if). TEM posnetka.



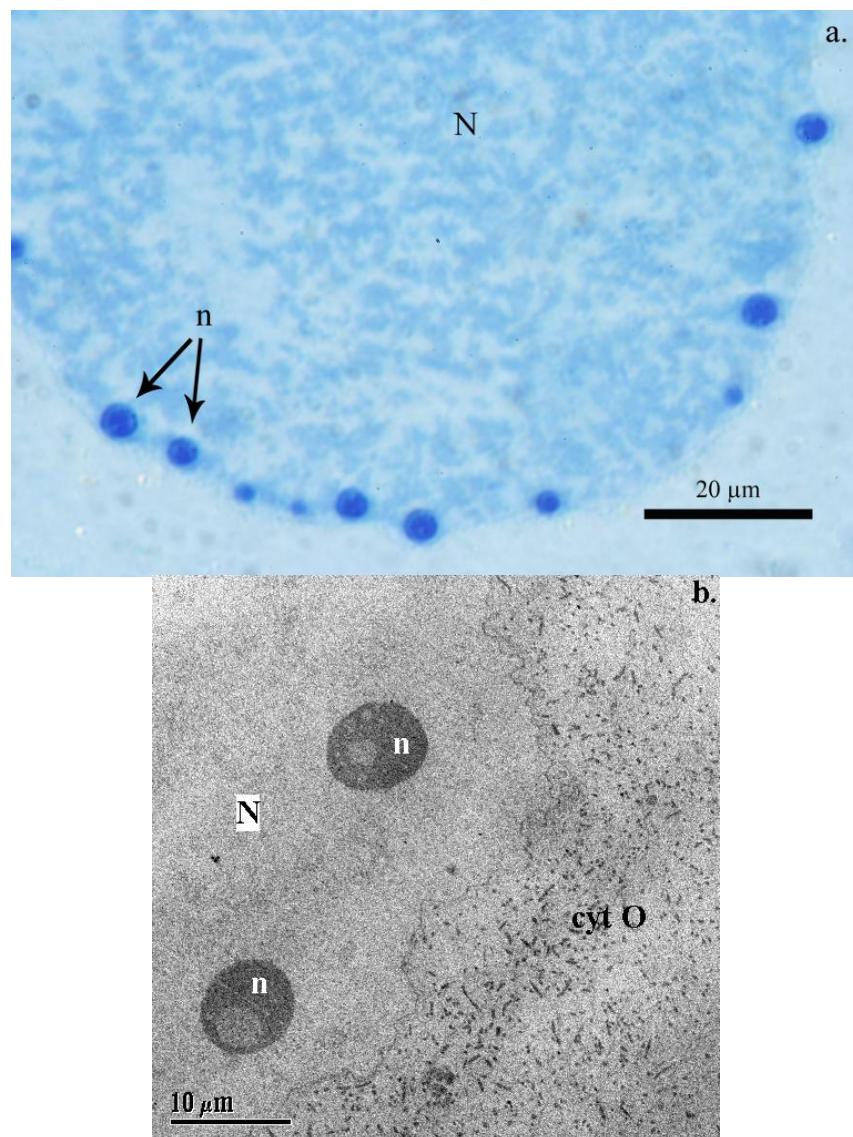
Slika 38. Lizosomi (puščica) v citoplazmi folikularne celice (Cyt fc). M – mitohondrij.  
TEM posnetek.

#### 4.2.2 Oocite II

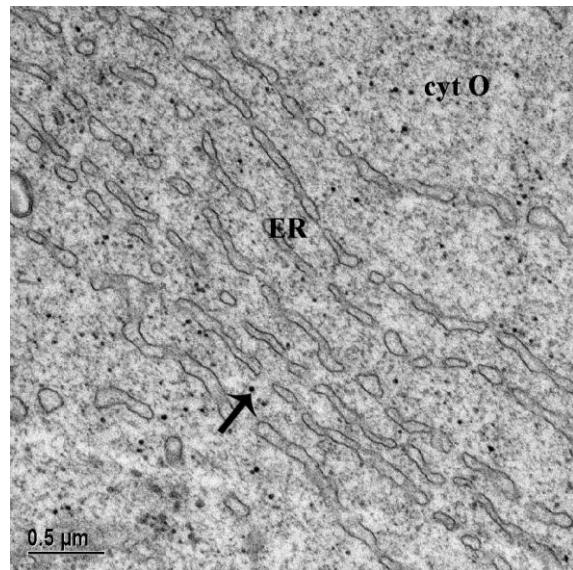
Oocite II so večje in merijo okrog 300–600 µm. V jedru so številna, večja jedrca, locirana ob jedrnem ovoju, ki je bolj naguban kot pri oocitah I (sl. 39 a, b). Citoplazma oocit II je nekoliko gostejša kot pri oocitah I, poleg tega pa je njihov membranski sistem bolj razvejan (sl. 40). Lipide kaplje so številnejše, prav tako mitohondriji, Golgijev aparat in mielinska telesa (sl. 41 a, b, c, d). V večjih oocitah so izrazite tudi anulatne lamele, sestavljeni iz nanizanih paralelnih membran, med katerimi je manjši prostor (sl. 42).

V robnem delu citoplazme so v enem sloju vzdolž ooleme prisotni elektronsko svetli vezikli različnih velikosti in z raznoliko vsebino (sl. 43 , 45 a). Njihova vsebina je bodisi zrnata, fibrilarna ali pa vključuje mielinska telesa, kot tudi lipidom podobno elektronsko gosto vsebino (sl. 43 b). Pri oocitah I so se vezikli pojavljali le posamično.

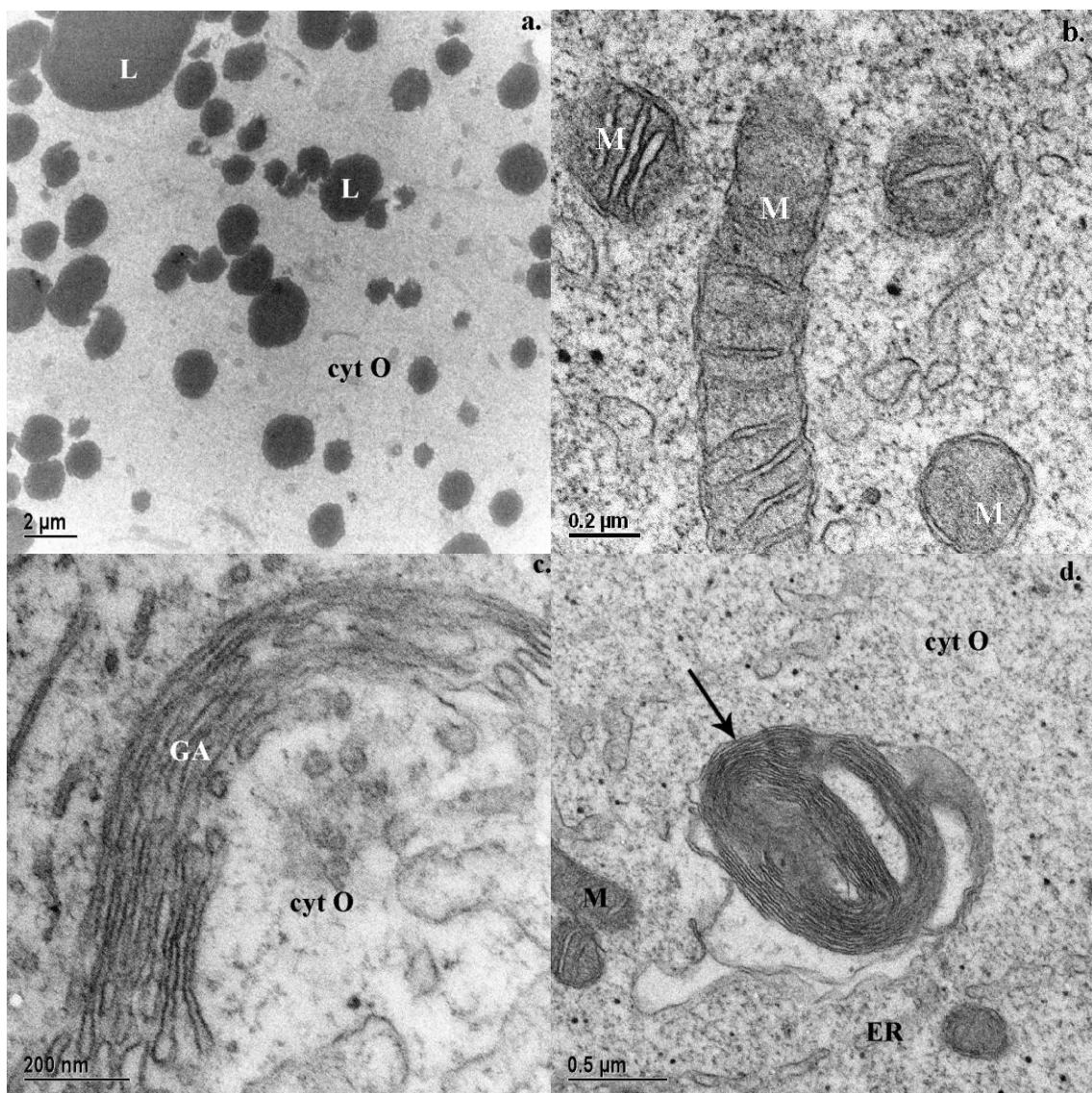
Tudi stiki med jajčno celico in folikularno celico so drugačni kot pri oocitah I. Mikrovili in makrovili so tanjši, daljši in številčnejši (sl. 44 a, b). Folikularne celice so številčnejše in bolj sploščene, med seboj so povezane z dezmosomi (sl. 45 a, b).



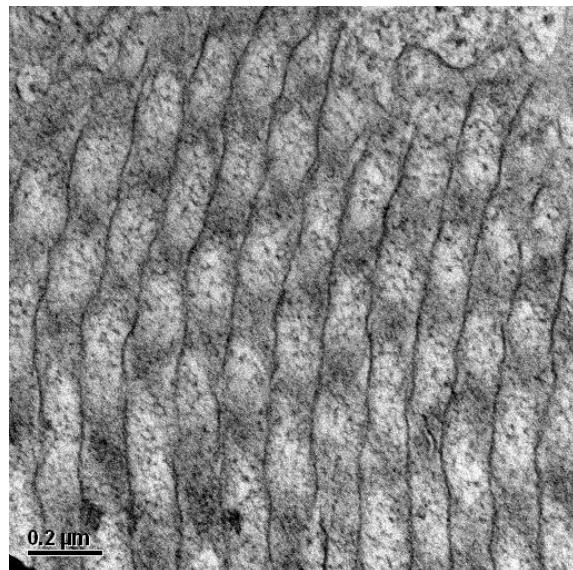
Slika 39 a, b. Jedrca (n) v jedru (N) Oocite II so povečana in številčnejša. Cyt O - citoplazma oocite. a. Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue. b. TEM posnetek.



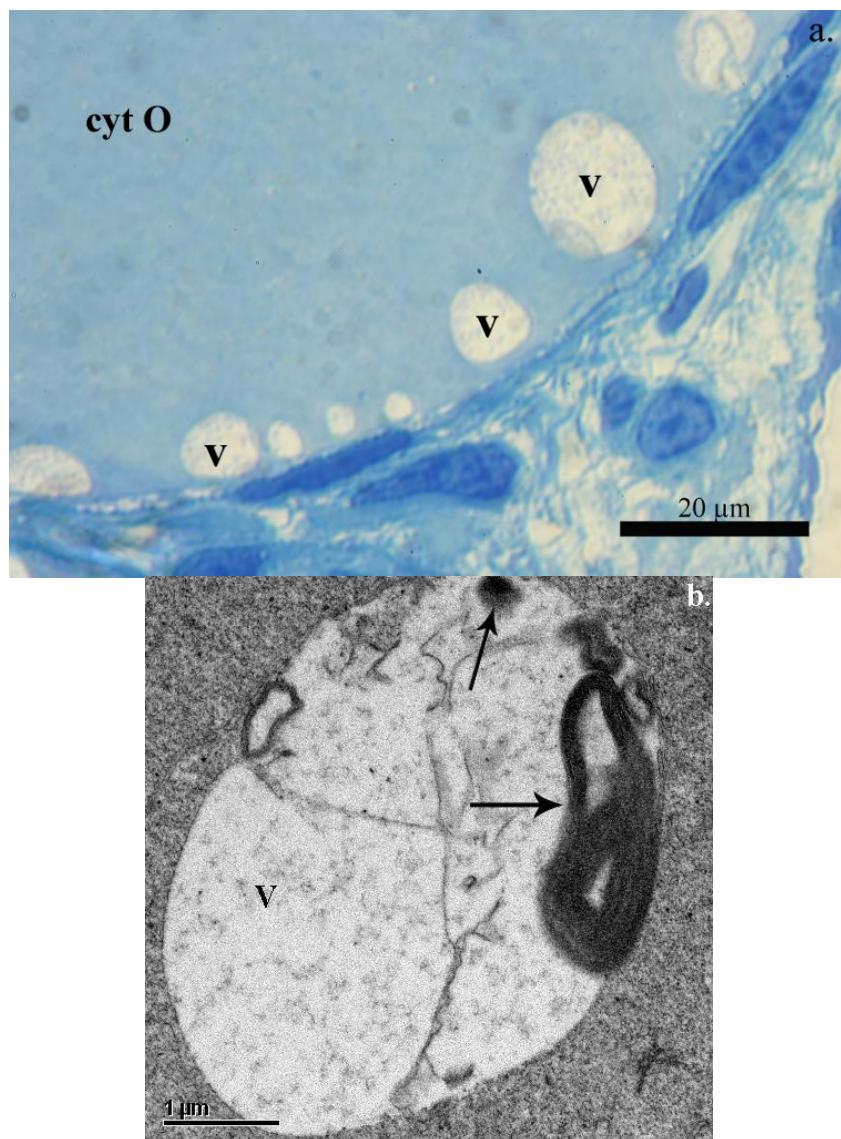
Slika 40. Membranski sistem (ER) v citoplazmi OII (cyt O). Glikogenske granule (puščica). TEM posnetek.



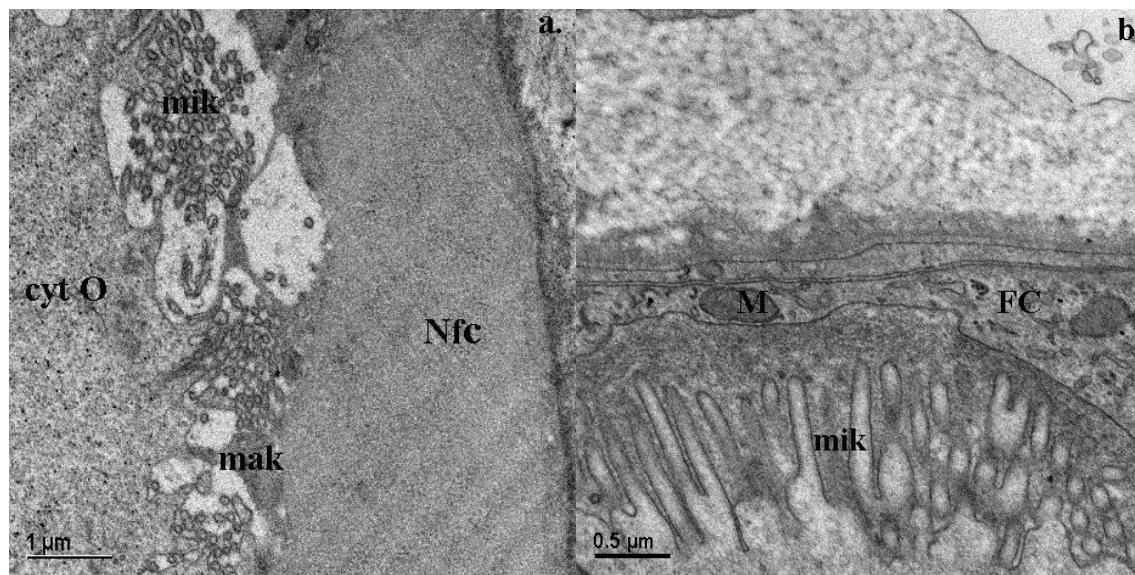
Slika 41 a, b, c, d. Organeli v citoplazmi oocite II (cyt O) Lipidne kaplje (L) (slika a), mitohondriji (M) (slika b), Golgijev aparat (GA) (slika c) in mielinska telesa (puščice) (slika d). ER - membranski sistem. TEM posnetki.



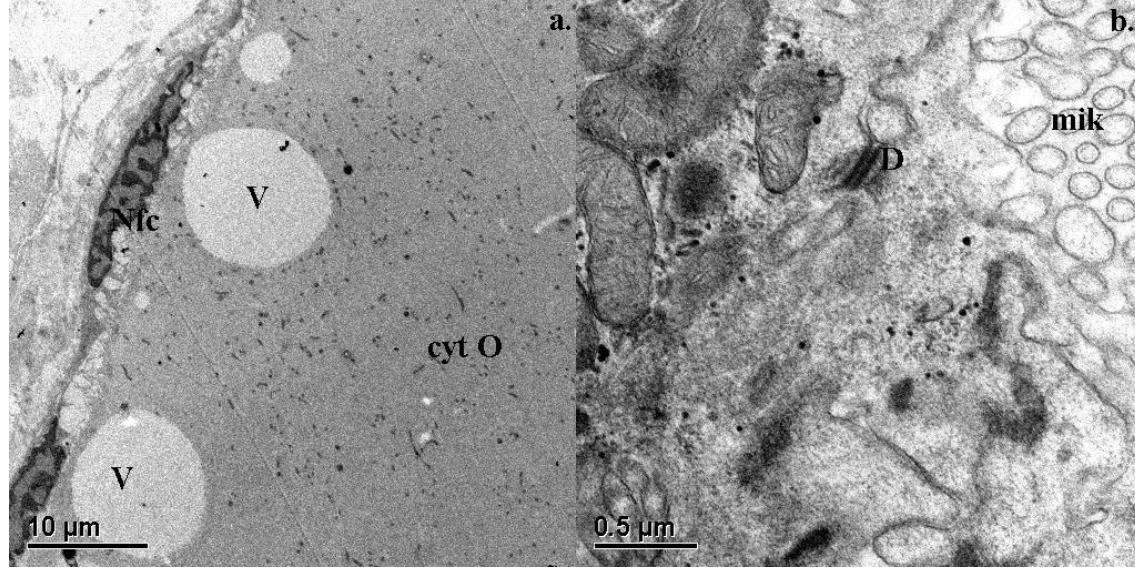
Slika 42. Anulatne lamele. TEM posnetek.



Slika 43 a, b. Vezikli (v) v robni citoplazmi oocite II (cyt O) s heterogeno vsebino. Puščici na sliki b označujeta mielinsko telo in lipidnim kapljam podobno elektronsko gosto vsebino. a. Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue. b. TEM posnetek.



Slika 44 a, b. Stik med oocito II in folikularno celico (FC). Nfc - jedro folikularne celice. mik - mikrovili. mak - makrovili. cyt O - citoplazma oocite II. M - mitohondrij. TEM posnetka.



Slika 45 a, b. Folikularne celice so sploščene (slika a) in se med seboj stikajo z dezmosomi (D) (slika b). V - vezikli v citoplazmi oocite II (cyt O). Nfc - jedro folikularne celice. mik - mikrovili oocite II. TEM posnetka.

## 5 DISKUSIJA

Med razvojem se v jajčni celici dogajajo številne spremembe. Razvoj od oogonijev do zrelih oocit poteka v več fazah, vsaka s specifičnimi morfološkimi značilnostmi. Omejili smo se na opazovanje zgodnjih faz razvoja in sicer na ultrastrukturo oogonijev ter previtelogenih oocit.

V steni razvijajočega ovarija dvoživk so somatske in zarodne celice (Spornitz in Kress, 1973; Ogielska in Bartmańska, 2009). Iz somatskih celic se s časom oblikujejo prefolikularne celice, iz zarodnih celic pa se razvijejo oogoniji.

Oogoniji so majhne celice, ki se mitotsko delijo. Proliferacija oogonijev poteka bodisi permanentno med reproduktivno dobo samice, bodisi je proliferacija omejena na juvenilni stadij osebka. Slednje je značilno za piškurje, hrustančnice, nekatere kostnice, ptice in sesalce (Tokarz, 1978). Oogoniji se tudi pri brezrepcih intenzivno delijo le v jajčnikih juvenilnih stadijev osebkov in oocite, ki nastanejo v tem obdobju zadoščajo za celotno reproduktivno dobo (Ogielska in Bartmańska, 2009). Novi oogoniji pri brezrepcih sicer nastajajo tudi v odrasli dobi, vendar večinoma propadejo. Pri repatih dvoživkah in nekaterih brezrepcih, kot tudi kostnicah in plazilcih pa se oogoniji mitotsko delijo ter vstopajo v nadaljne faze razvoja skozi celotno reproduktivno obdobje osebka (Aranzábal, 2009). Slednje najverjetneje drži tudi za močerila, mitotske faze oogonijev smo zasledili pri vseh pregledanih ovarijih različno starih samic.

Po seriji delitev primarnih oogonijev nastanejo pri dvoživkah gnezda sekundarnih oogonijev (Ogielska in sod., 2010), ki so povezani s citoplazemskimi mostički. Nastanejo tako, da se citokineza po mitotski delitvi ne zaključi popolnoma (Ogielska in sod., 2010). Opisujejo jih pri zelo različnih skupinah vretenčarjev: dvoživkah, ribah, plazilcih, ptičih ter sesalcih (Tokarz, 1978). Njihove najpomembnejše vloge naj bi bile usklajevanje razvoja oogonijev v gnezdu (Coggins, 1973), omogočanje komunikacije ter prenosa signalov med celicami, prav tako pa naj bi imeli pomembno vlogo pri propadu posameznih oogonijev ter regulaciji njihovih mitotskih delitev (Tokarz, 1978). Citoplazemski mostički so prisotni

tudi med oogoniji skupka v ovarijih močerila, medtem ko jih pri oocitah nismo več zasledili, saj so celice folikularnega ovoja obdale posamezne oocite.

Tako kot pri ostalih dvoživkah, tudi pri močerilu oogonijska gnezda obdajajo prefolikularne celice. Folikulogeneza poteka podobno pri vseh vretenčarjih in je približno časovno usklajena z nastopom mejotske profaze (Tokarz, 1978). Takrat se začno folikularne celice vrivati v gnezdo oocit ter v končni fazi popolnoma obdajo posamezne zarodne celice. V tej fazi izginejo tudi citoplazemski mostički in jajčne celice se začno razvijati posamično (Ogielska in Bartmańska, 2009). Folikularni ovoj je enoslojen in ostane tak med celotnim razvojem oocite (Aranzabál, 2009). Med seboj so folikularne celice povezane z dezmosomi, kar opisujejo tudi za ostale dvoživke (Sretarugsa in sod., 2001).

Folikularni ovoj ima številne vloge pri razvoju jajčne celice. Tu naj bi potekala sinteza nukleinskih kislin, lipidov, sladkorjev in proteinov, ki služijo nato nadaljnemu razvoju jajčne celice (Kessel in Panje, 1968). Pomembno vlogo ima pri nastajanju sekundarnega jajčnega ovoja in prenosu različnih snovi iz krvnih kapilar do same oocite. Snovi prehajajo v oocito z difuzijo in endocitozo (Aranzabál, 2009).

Skladno z njihovo vlogo imajo folikularne celice veliko mitohondrijev, Golgijevih kompleksov, veziklov in lipidnih kapelj (Gülsoy in sod., 2006). Številni intermediarni filamenti imajo vlogo citoskeleta. Lipidov je med folikulogenezo vedno več, saj se v folikularnih celicah akumulirajo (Kessel in Panje, 1968). Izrazite akumulacije lipidov v FC pri močerilu nismo zasledili, so pa zastopane posamične lipidne kaplje.

Z rastjo jajčne celice transport snovi s pinocitozo, ki poteka med plazmalemo oocite in folikularnih celic, ne zadošča več potrebam celice, zato se začne povečevati njuna stična površina (Odor, 1960). To se zgodi na račun pojava prstastih izrastkov plazmaleme obeh tipov celic. Pojav je značilen za vse vretenčarje, tako kostnice (Anderson, 1967), dvoživke (Sánchez in Villecco, 2003), kot tudi sesalce (Franchi, 1960). Izratske, ki so citoplazemskega izvora opisujejo pri oocitah kot mikrovile, tiste, ki izraščajo s površine folikularnih celic pa makrovile (Matova in Cooley, 2001). Mikrovilom in makrovilom nudijo oporo aktinski filamenti (Browder in sod., 1980; Ogielska in Bartmańska, 2009). Pri

močerilu se mikro in makrovili pojavljajo v prvi fazi zoritve oocit (oocite I) ter se nato daljšajo in postajajo vedno številčnejši, v skladu z rastjo jajčne celice ter njenih potreb po izmenjavi snovi. Nekateri avtorji (Sánchez in Villecco, 2003) opisujejo mikrovile kot tanjše, krajše in elektronsko manj goste izrastke od makrovilov. Pri močerilu bistvenih razlik med mikrovili in makrovili nismo opazili, razen pogostih izrazito debelih makrovilov, ki so običajno v neposrednem stiku z oocito.

Večina oogonijskih jeder v ovarijih močerila je v interfazi. V njih prevladuje nezgoščen evkromatin, medtem ko so skupki hetrerokromatina koncentrirani predvsem ob jedrnem ovoju. Znotraj enega oogonijskega gnezda so lahko jedra v različnih fazah delitve. Prav tako se mitotske delitve pojavljajo ne glede na letni čas. Pri močerilu so telofazna jedra režnjasta. Značilno režnjasto obliko telofaznih jeder opisuja Cross in Mercer (1993). V ovariju so razen oogonijskih gnezd tudi posamezni oogeniji, za katere pa s svetlobnim mikroskopom nismo uspeli določiti ali so to sekundarni ali primarni oogeniji. Ti so namreč pri močerilu ravno tako posamezni, z nepravilno oblikovanim jedrom in obdani s somatskimi celicami.

Po seriji mitotskih delitev oogenij vstopi v prvo mejotsko delitev. Za jedra diploten faze I. mejotske delitve so značilni krtačasti kromosomi, ki jih opisujejo pri kostnicah, dvoživkah in pticah in so pomembni za sintezo RNA (Old in sod., 1977, cit. po Sánchez in Villecco, 2003). Sinteza poteka na zankah, ki se lateralno iztezajo iz kromatid.

Pri oocitah I in II krtačastih kromosomov nismo zasledili, saj v tem obdobju zoritve še niso izraziti. Značilni so za tretjo in ostale zoritvene faze oocit močerila (Žibert, 2010).

Jedrca ali nukleolusi se pojavljajo v jedru oocit vretenčarjev v različnem številu. V jedru oogenijev kostnic največkrat opisujejo le eno veliko jedrce (Bruslé in Bruslé, 1978; Abdalla in Cruz Landim, 2003; Gülsøy, 2007). Pri dvoživkah število jedrc varira od enega do treh (Guraya, 1965; Coggins, 1973). Pri oogenijih močerila opazimo dve do štiri jedrca v interfaznem ali telofaznem jedru, pri oocitah pa so jedrca pomnožena in povečana na obodu jedra. Največje število jedrc v jedru pri dvoživkah je značilno za pahiten fazo mejoze (Brachet, 1979). Ta očitno sovpada z II zoritveno fazo oocit močerila, ko so jedrca najštevilčnejša (Žibert, 2010). Vloga jedrc je sinteza ribosomov, ki se kopijo v citoplazmi

oocite in zagotavljanje zadostne količine proteinov potrebnih za rast in razvoj bodočega embrija v zgodnji fazi razvoja (Browder in sod., 1980).

V citoplazmi tako oogonijev, kot pozneje oocit so prevladujoči celični organeli mitohondriji, ki zagotavljajo razvijajoči se jajčni celici in pozneje embriju energijo v obliki ATP. Najdemo jih v citoplazmi vseh aerobnih evkariontskih celic in so najbolj razpoznavni po njihovi dvojni membrani, ki imata različno sestavo in različno permeabilnost (Ghadially, 1997). Notranja membrana mitohondrija tvori kriste, ki so v oogonijih jajčnika močerila različnih oblik, kriste so bodisi lamelarne, tubularne ali vezikularne. Različne oblike mitohondrijev z različnimi kristami smo opazili tudi znotraj ene jajčne celice. V oogonijih so pogosti mitohondriji z razširjenim, nepopolnim obodom oz. transformirani mitohondriji.

Želazowska in Kilarški (2009) opisujeta v jajčniku pri jesetu *Acipenser gueldenstaedtii* dva morfološka tipa mitohondrijev. Prvi tip z dobro razvitimi kristami ima vlogo pri transportu RNA (Želazowska in sod., 2007) in pri tvorbi energije za transport zarodne plazme znotraj citoplazme (Chan, 2006, cit. po Želazowska in Kilarški, 2009). Drugi tip pa so tako imenovani transformirani mitohondriji. So skoraj sferične oblike z nepravilno oblikovanimi kristami, ali pa teh ponekod sploh ni. Značilni so za previtelogene faze oocit. Njihova poglavita vloga pa naj bi bila tvorba proteinov in jajčnega ovoja ter germinalnih celičnih determinant, za katere v starejši literaturi uporabljajo izraz »nuage«, saj niso poznali vloge nukleoplazmi podobnih skupkov (Želazowska in sod., 2007). Transformiran tip mitohondrijev se pojavlja tako v vretenčarskih, kot v nevretenčarskih gametah. Morfološko različni mitohondriji so značilni tudi za mišične in živčne celice (cit. v Želazowska in Kilarški, 2009). Poznano je, da med nastanjem mitohondriji spreminjajo obliko, se delijo in združujejo (Ghadially, 1997). Mitohondriji nepravilnih ali nepopolnih oblik v oogonijih močerila so lahko odraz mitohondriogeneze. V oogonijih, kot tudi v oocitah namreč poteka intenzivno povečevanje števila mitohondrijev, ki zagotavljajo potrebno energijo za razvoj embrija (Browder in sod., 1980; Gilbert, 2003).

Avtorji opisujejo tri različne načine nastanka novih mitohondrijev; le-ti naj bi nastali iz matriksa, iz nemitohondrijskih struktur kot so jedrni ovoj (Hoffman in Grigg, 1958; Brandt

in Pappas, 1959, cit. po Ghadially, 1997), celična membrana (Geren in Schmitt, 1954; De Robertis in Bleichmar, 1962, cit. po Ghadially, 1997), pinocitotski vezikli (Gey, 1956, cit. po Ghadially, 1997) in mikrotelesa (Rouiller in Bernhard, 1956; Engfeldt in sod., 1958, cit. po Ghadially, 1997) ter iz že obstoječih mitohondrijev, ki je najbolj verjeten način nastajanja novih mitohondrijev.

Pogosti vključki oogonijev in oocit v jajčniku močerila so tudi lipidne kaplje. Velikokrat se mitohondrij stika z lipidno kapljo ali pa je v skupku lipidnih kapelj tudi veliko mitohondrijev. V oogonijih in oocitah I lipidne kaplje skupaj z mitohondriji oblikujejo homogeno maso ob jedru. Slednja je obsežnejša in izrazitejša v oocitah I, pri oocitah II pa se homogena masa razprši okoli jedra in po vsej citoplazmi. Podobno strukturo imenovano lipidno telo opisujeta Želazowska in KilarSKI (2009) v oocitah pri jesetu. Zaradi stikov mitohondrijev z lipidnimi kapljami ne izključujeta možnosti, da imajo slednje lahko tudi deloma mitohondrijski izvor. Biogeneza lipidnih kapelj v oocitah pravzaprav še ni popolnoma razjasnjena. Omenjena avtorja izključujeta kakršnokoli zvezo lipidnega telesa oocit jeseta z Balbanijevim telesom, saj v nasprotju z njim ne vsebuje značilnih organelov in določenih značilnih molekul RNA. Balbanijevo telo ali mitohondrijski oblak je značilna struktura previtelogenih oocit tako nevretenčarjev in vretenčarjev, vključno s sesalci (Kloc in Etkin, 2005). Njegova oblika, kot tudi ultrastruktura je lahko zelo variabilna in ni nujno, da je pri vseh vretenčarjih prisotna kot prominentna sferična struktura ob jedru. Struktura je podrobneje opisana pri žabi krempljičarki *Xenopus laevis*, sestavlja jo predvsem mitohondriji in elektronsko gost granulofibrilarni material (GFM) (Kloc in Etkin, 2005). Služi pa predvsem kot sredstvo za prenos germinalnih determinant in lokalizacijo RNA na vegetalni del oocite (Kloc in Etkin, 1995 cit v Kloc in Etkin, 2005).

Golgijev aparat (GA) ima vlogo modifikacije produktov, encimi v cisternah modificirajo proteine z dodajanjem ogljikovih hidratov in fosfatov, ti pa predstavljajo signal za določen organel ali eksocitozo. GA ima vlogo tudi pri metabolizmu lipidov in polisaharidov ter pri razvrščanju produktov v vezikle, s pomočjo katerih se proteini, lipidi in polisaharidi prenašajo iz GA do določenega cilja. Sestavljen je iz sploščenih cistern. Produkti vstopajo na konveksni, cis strani in izstopajo na konkavni, trans strani. Z odcepljanjem od Golgijevega aparata nastajajo kortikalne granule v citoplazmi oocite. To so sferične

strukture omejene z membrano, ki vsebujejo kisle mukopolisaharide in proteine (Browder in sod., 1991). Kortikalne granule so najprej naključno razporejene po citoplazmi, kasneje pa migrirajo proti obrobju celice (Gilbert, 2003). Spornitz in Kress (1973) sta pri oocitah nektura opazila podobnost med vezikli v kortikalni regiji z vezikli ob Gogijevem aparatu in izpostavljata možnost prenosa materiala od GA do vitelinske ovojnice, torej udeležbo veziklov kortikalne regije pri sintezi vitelinske ovojnice. Številne ponovitve Golgijevega aparata tako v oogonijih kot v oocitah močerila izkazujejo veliko sintetsko aktivnost jajčnih celic.

Anulatne lamele (AL) opisujejo za vse faze oogeneze dvoživk, od primarnih oogonijev, do poznih oocit v diplotenu (Kress in Spornitz, 1972, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009; Wang in Hsü, 1974, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009; Kress, 1982; Ogielska in Wagner, 1990, 1993, cit. po Ogielska in Bartmańska, 2009). Opisujejo jih tudi v spermatogonijih, različnih somatskih celicah in nekaterih rakastih celicah. Sestavlja jih kompleks vzporednih membran, ki so perforirane s porami katerih zgradba spominja na pore jedrnega ovoja. Število membran v anulatnih lamelah varira, prav tako njihova dolžina ter položaj v ooplazmi, ki pa se spreminja s časom oz. fazo zoritve (Imoh in sod., 1983 cit. v Ogielska in Bartmánska, 2009). Pri močerilu anulatnih lamel v oogonijih nismo zasledili, prav tako so bile maloštevilne in manj izrazite v oocitah prve zoritvene faze, pogosteje zastopane in kompleksnejše pa so bile v oocitah druge zoritvene faze. Izvor in funkcija anulatnih lamel še niso popolnoma razjasnjena in so še zmeraj predmet obravnav. Anulatne lamele imajo tesen stik s številnimi celičnimi organeli. Pogosto se membrane AL nadaljujejo v gladek ali zrnat endoplazemski retikulum, kar kaže na morebitno vlogo pri proteinski sintezi. Nekateri raziskovalci menijo (citirano v Ghadially, 1997), da anulatne lamele sodelujejo v procesih celične rasti in diferenciacije, saj so v kličnih in tumorskih celicah mnogo bolj pogoste kot v odraslih somatskih celicah. Podobnost z jedrnim ovojem, kot tudi pozicija ob jedru nakazuje na možnost, da AL nastanejo iz jedrne ovojnice in za celico predstavljajo založno obliko ovoja ali celo jedrnega pornega kompleksa (Ogielska in Bartmánska, 2009).

Jajčne celice močerila so v marsikaterih značilnosti podobne oocitam ostalih dvoživk. Gladek endoplazemski retikulum in številni ribosomi v citoplazmi so prav tako značilni za

večino dvoživk (Sretarugsa in sod. 2001; Aranzábal, 2003). Anulatne lamele so značilne za spolne celice tako vretenčarjev kot nevretenčarjev (Kessel, 1965; Ghadially, 1997). Izrazit in razvejan membranski sistem značilen za oocite močerila opisujejo tudi Kessel in sod. (1986) za oocite nektura. Največja posebnost oocit močerila je številčnost lipidnih kapelj, saj pri nobeni drugi vrsti dvoživk niso tako številne. Količina lipidnih kapelj v oocitah močerila je najbolj primerljiva z oocitami jesetra in nekaterih drugih vrst rib (Sarasquete in sod., 2002; Želazowska in Kilarski, 2009). Sferično maso ob jedru imenovano Balbanijevo telo ali mitohondrijski oblak opisujejo za oocite pri večini vretenčarskih vrst (Guraya, 1962; Browder in sod., 1980; Aranzábal, 2003; Gülsøy, 2007). V oocitah močerila jo sestavljajo predvsem lipidne kaplje in morfološko raznoliki mitohondriji in je najbolj primerljiva z lipidnim telesom v oocitah jesetra, za katero avtorja (Želazowska in Kilarski, 2009) izključujeta homologijo z Balbanijevim telesom oz. mitohondrijskim oblakom, saj v nasprotju z njim ne vsebuje tipičnih organelov in določenih značilnih RNAs. V našem primeru je potrebno narediti hibridizacijo in situ, ki bi omogočila lokalizacijo specifičnih molekul RNA in imunolokalizacijo, za potrditev vloge omenjene strukture.

## 6 SKLEPI

- V vseh jajčnikih so vedno prisotni oogoniji (Oo) in previtelogene faze oocit (OI in OII).
- Oo so večinoma v skupkih ali gnezdih v vezivnem tkivu robnega dela ovarija. Gnezda merijo od 60 do 150  $\mu\text{m}$  in štejejo od 2 do 30 oogonijev. Med Oo skupka so oblikovani citoplazemski mostički. Posamezni oogoniji so maloštevilni.
- Jedro Oo je veliko, premera 20  $\mu\text{m}$  z 2 do 4 jedrci. V OI in OII se število jedrc povečuje, nameščena so predvsem ob jedrnem ovoju.
- Znotraj istega oogonijskega gnezda so oogoniji v različnih fazah mitotske delitve. Slednje se pojavljajo ne glede na letni čas.
- Citoplazma Oo je svetla in redka. Membranskega sistema značilnega za oocite v Oo še ni. Cisterne ER so le posameze. ER je gladek, ribosomi so prosti v citoplazmi. Prisotni so kompleksi GA.
- Mitochondriji Oo so izrazito morfološko raznoliki. Imajo lamelarne, tubularne ali vezikularne kriste. Matriks je različno elektronsko gost. Pogosti so mitochondriji z bočnimi razširtvami membrane oz. transformirani mitochondriji ki jih v OI in OII ne zasledimo. Število M se pri OI in OII poveča.
- Lipidne kaplje so prisotne že v oogonijih, z zorenjem oocit se njihova količina povečuje. Skupaj z mitochondriji oblikujejo lipidno maso ob jedru, ki je v oocitah I izrazitejša, v oocitah II pa se razprši okoli jedra in po citoplazmi.
- Citoplazma OI in OII je elektronsko gostejša kot pri Oo. V njej je večje število celičnih organelov in razvejan membranski sistem. Pogoste so anulatne lamele, ki so izrazitejše v OII.

- Posebnost OII so različno veliki vezikli z raznoliko vsebino v enojnem sloju pod plazmalemo.
- Oogonijska gnezda obdajajo prefolikularne celice, ki v procesu folikulogeneze postanejo folikularne celice in obdajo posamezne oocite.
- Površina za izmenjavo snovi med folikularnimi celicami in oocito se postopno povečuje. Pri Oo je stična površina še nenagubana, pri OI so mikrovili in makrovili že izraziti, pri OII pa so mikrovili in makrovili daljši in številčnejši.

## 7 POVZETEK

Ovarijske močerile (*Proteus anguinus anguinus*) smo pregledali s svetlobnim in presevnim elektronskim mikroskopom in opisali ultrastrukturo jajčnih celic v zgodnji stopnji zoritve. Pregledali smo ovarije enajstih samic. Osredotočili smo se na oogonije ter oocite I. in II. zoritvene faze. Slednje so v previtelogeni fazni oogeneze, ko se rumenjak v citoplazmo jajčne celice še ne nalaga. Pozorni smo bili predvsem na morfologijo jedra, homogeno objedrno maso, morfologijo in pojavnost celičnih organelov ter na stične površine med sosednjimi jajčnimi celicami, kot tudi med jajčno celico in folikularnimi celicami.

V ovariju močerila so oogoniji v skupkih od 2 do 30 oogonijev v vezivu robnega dela. Velikost skupkov je od 60 do 150 µm. Posamezni oogoniji obdani s somatskimi celicami so maloštevilni. Oogoniji skupka so med seboj povezani s citoplazemskimi mostički, ki so nastali z nepopolno citokinezo pri mitotskih delitvah. Poleg komunikacije in prenosa signalov imajo predvsem vlogo usklajevanja razvoja jačnih celic znotraj gnezda, kot tudi pri regulaciji njihovih mitotskih delitev. V našem primeru so oogoniji znotraj istega gnezda v različnih fazah mitotske delitve. Slednje se pojavlajo tekom celega leta, ne glede na letni čas.

Jedra oogonijev so velika, premora 20 µm in zavzemajo večino prostornine oogonija. Jedrc je malo, od ena do štiri in so vidna le v interfaznih in telofaznih jedrih. Jedra so glede na fazo mitoze različnih oblik. Interfazna jedra so pravilne, okrogle oblike, jedra v telofazi pa nepravilna, pogosto režnjasta. V anafazi so lepo vidni kromosomi, ki potujejo na nasprotna pola celice. Mejotska jedra oocit imajo večje število jedrc kot jedra oogonijev. Jedrca so ob jedrnem ovoju, ki je pri oocitah II. zoritvene faze izrazito naguban. Tako pri oogonijih, kot tudi previtelogenih fazah oocit jedro leži v središču jajčne celice.

Tudi v citoplazmi se dogajajo spremembe tekom zoritve jajčnih celic. Svetla, elektronsko redka citoplazma oogonijev še ne vsebuje membranskega sistema. Cisterne endoplazemskega retikuluma so posamezne, gladke in brez ribosomov. Ribosomi in poliribosomi so prosti v citoplazmi, njihovo število je v oocitah večje kot v oogonijih.

Golgijev aparat je zastopan v več skupkih, številne so lipidne kaplje in mitohondriji (M) različnih oblik in z različnimi kristami, ki so lahko lamelarne, vezikularne ali tubularne. Pogoste so bočne razširitve membrane mitohondrijev oziroma transformirani mitohondriji. Matriks M je bodisi elektronsko svetel ali pa gost. Številčnost mitohondrijev se v oocitah I in II še povečuje. Prav tako so različnih oblik, velikosti in z različno oblikovanimi kristami, ne opazimo pa mitohondrijev z bočnimi razširitvami membrane.

Tekom razvoja jajčne celice se zaradi povečane metabolne aktivnosti povečuje tudi število kompleksov GA, ki ima vlogo pri metabolizmu lipidov in polisaharidov ter pri razvrščanju produktov v vezikle. Vezikli, ki izhajajo iz GA imajo elektronsko svetlo vsebino. Izrazito se povečuje tudi število lipidnih kapelj (L), ki so lahko pravilnih, okroglih ali nepravilnih oblik. Lipidne kaplje so večinoma v manjših skupkih in skupaj z mitohondriji oblikujejo homogeno maso ob jedru. Slednja je zastopana že pri oogonijih in je še izrazitejša v oocitah I, pri oocitah II pa se homogena masa razprši okoli jedra in po citoplazmi. V oocitah I se že oblikuje membranski sistem, ki je pri oocitah II obsežen in zelo razvejan. V citoplazmi oocit I in II so tudi anulatne lamele sestavljene iz paralelnih membran, ki so v oocitah II izrazitejše. Pri dvoživkah jih opisujejo za vse faze razvoja jačnih celic, vendar jih pri oogonijih močerila nismo zasledili. Posebnost robne citoplazme oocit II so tudi različno veliki vezikli z raznoliko vsebino. Pri oocitah I se pojavljajo posamično, v oocitah II pa so številčnejši, urejeni v en sloj vzdolž ooleme. Njihova vloga je najverjetneje privzem snovi v citoplazmo oocite in prenos materiala v perivitelinski prostor za izgradnjo vitelinskega ovoja.

Velikost jajčnih celic tekom zoritve narašča. Oogoniji merijo od 17 do 50  $\mu\text{m}$ , oocite I od 100 do 300  $\mu\text{m}$  in oocite II okrog 300–600  $\mu\text{m}$ .

Gnezda oogonijev obdajajo prefolikularne celice. Imajo veliko, temno obarvano jedro z izrazitimi območji evkromatina in heterokromatina. V njihovi citoplazmi so mitohondriji, GA, lipidne kaplje, ribosomi in cisterne ER. Zaradi intermediarnih filamentov je citoplazma prefolikularnih celic videti elektronsko gosta. Med seboj se povezujejo z dezmosomi, z oolemo Oo pa so v neposrednem stiku, mestoma so opazna manjša nagubanja plazmaleme Oo in prefolikularnih celic.

Folikularne celice v procesu folikulogeneze sčasoma obdajo posamezne oocite ter začno v prvi zoritveni fazi oocit tvoriti makrovile, prav tako pa izrastke v tej fazi tvori tudi oolema. Na mestih, kjer se plazmalemi oocit in FCs neposredno stikata so vidne dezmosomom podobne zgostitve. V II. zoritveni fazi so mikrovili in makrovili še večji in številčnejši zaradi povečanja izmenjevalne površino med jajčno in folikularno celico, za potrebe rasti in razvoja.

## 8 LITERATURA

### 8.1 CITIRANI VIRI

1. Abdalla F.C., Cruz-Landim C. 2003. Some histological and ultrastructural aspects of oogenesis in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei). *Braz. J. Morph Sci*, 20: 3-10
2. Al-Mukhtar K. A. K., Webb A. C. 1971. An ultrastructural study of primordial germ cells, oogonia and early oocytes in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 26: 195-217
3. Anderson E. 1967. The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts. *J Cell Biol*, 35, 1: 193-212
4. Aranzábal M.C.U. 2009. Oogenesis and female reproductive system in Amphibia-Urodela. In: Reproduction of Amphibians. Ogielska M. (ed.). Science Publishers, Inc., USA: 273-301
5. Aranzábal M.C.U. 2003. The ovary and oogenesis. In: Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela. Volume 1. 1st edition. Sever D.M. (ed.). Science Publishers, Inc., USA: 133-150
6. Beyo R. S., Oommen O. V., Akbarsha M.A. 2006. Ultrastructural features of follicle cell-oocyte interface during different stages of follicles in the caecilian *Ichthyophis tricolor*. *JER*, 10: 52-55
7. Bizjak-Mali L., Bulog B. 2010. Ultrastructure of previtellogene oocytes in the neotenic cave salamander *Proteus anguinus anguinus* (Amphibia, Urodela, Proteidae). *Protoplasma* 246: 33-39

8. Bonnanfant-Jaïs M.-L., Mentré P. 1983. Study of oogenesis in the newt *Pleurodeles waltlili* M. I. Ultrastructural study of the different stages of oocyte development. J. Submicrosc Cytol, 15: 453-478
9. Bozzola J.J., Russel L.D. 1991. Electron microscopy. 2nd edition. Jones and Bartlett Publishers, ZDA
10. Brachet J. 1979. Oogenesis and maturation in amphibian oocytes. Endeavor, 3: 144-149
11. Browder L.W., Erickson C.A., Jeffrey W.R. 1991. Developmental biology, 3. izdaja, Harcourt Brace College Publishers, ZDA
12. Bruslé S., Bruslé I., 1978. An ultrastructural study of early germ cells in *Mugil* (Liza) *auratus* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). Ann Biol Anim Bioch Biophys, 18, 5: 1141-1153
13. Coggins L.W. 1973. An ultrastructural and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis*, J Cell Sci 12: 71-93
14. Cross P.C., Mercer KL. 1993. Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective. WH Freeman & Co, ZDA
15. Dumont J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages in laboratory maintained animals. J Morphol, 136: 153-180
16. Durand J-P., Delay B. 1981. Effects of the thermic conditions on the differentiation and adaptation of Proteus to the subterranean climatic conditions. Journ. Of Thermal Biology, 6, 1: 53-57
17. Exbrayat J.M. 2009. Oogenesis and female reproductive system in Amphibia-Gymnophiona. In: Reproduction of Amphibians. Ogielska M. (ed.). Science Publishers, Inc., USA: 305-335
18. Franchi L. L. 1960. Electron microscopy of oocyte-follicle cell relationship in the rat ovary. J Biophys Biochem Cytol, 7: 397-399

19. Gatenby J.B. 1916. The transition of peritoneal epithelial cells into germ cells in some Amphibia Anura, especially in *Rana temporaria*, Quarterly Journal of Microscopical Science, Vol s2-61, 275-300
20. Ghadially F.N. 1997. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 4 izdaja, Butterworth-Heinemann, Boston
21. Gilbert S.F. 2003. Developmental biology, 7 izdaja, Sinauer Associates, Inc., Publishers, USA
22. Guraya S.S. 1962. The structure and function of the so-called yolk-nucleus in the oogenesis of birds, J micr Sci 103 4: 411-15
23. Guraya S.S. 1965. A comparative study of fish (*Channa maruleus*) and amphibian (*Bufo somaticus*) oogenesis. Z Zellforsch Mikrosk Anat 65: 662-700
24. Gülsöy N. 2007. Development of the yolk nucleus of previtellogenic oocytes in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Studied by Light Microscopy. JABS, 1, 2: 33-35
25. Gülsöy N., Aytekin Y., Yüce R., 2006. Changing of Follicular Epithelium During Oogenesis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.), Studied by Light and Electron Microscopy. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9: 935-939
26. Juberthie C., Durand J., Dupuy M. 1996. La reproduction des protées (*Proteus anguinus*): Bilan de 35 ans d'élevage dans les grottes laboratoires de Moulis et D'Aulignac, Mémoires de Biospeologie, Tome XXIII p. 53-56
27. Kessel R.G., Panje W.R. 1968. Organization and activity in the pre- and postovulatory follicle of *Necturus maculosus*, J Cell biol, 39: 1-34
28. Kessel R.G., Tung HN, Beams HW, Lin JJC 1986. Is the nuclear envelope a generator of membrane? Developmental sequences in cytomembrane elaboration. Cell tissue Res 245: 61-68

29. Kiernan J.A. 1990. Histological and histochemical methods: Theory and practise.  
2nd edition, Oxford, Pergamon press
30. Kloc M., Etkin L.D. 2005. RNA localization mechanisms in oocytes, J Cell Sci 118, 269-282
31. Masood-Parvez U., Nadkarni V. B. 1993. The ovarian cycle in an oviparous Gymnophione Amphibian, *Ichthyophis beddomei* (Peters). Journal of Herpetology, 27: 59-63
32. Matova N., Cooley L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. Dev Biol, 231, 2: 291-320
33. Odor D. L. 1960. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. J Biophys Biochem Cytol, 7: 567-574
34. Ogielska M., Bartmańska J. 2009. Oogenesis and female reproductive system in Amphibia-Anura. In: Reproduction of Amphibians. Ogielska M. (ed.). Science Publishers, Inc., USA: 153-245
35. Ogielska M., Rozenblut B., Augustyńska R., Kotusz A. 2010. Degeneration of germ line cells in amphibian ovary. Acta Zoologica (Stockholm), 91: 319-327
36. Presnell, J.K., Schreibman M.P. 1997. Humanson's Animal Tissue Techniques. 5 izdaja, The Johns Hopkins University Press, Baltimore in London
37. Sánchez S.S., Villecco E.I. 2003. Oogenesis. In: Reproductive Biology and Phylogeny of Anura. Volume 2. 1st edition. Jamieson G.M. (ed.). Science Publishers, Inc., USA: 27-71
38. Sarasquete C., Cárdenas S., de González C.M., Pascual E. 2002. Oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L.: a histological and histochemical study. Histol Histopathol, 17, 3: 775-788
39. Selman K., Wallace R., Sarka A., Qi X. 1993. Stages of oocyte development in the Zebrafish *Brachydanio rerio*. J Morphol, 218: 203-224

40. Spornitz U.M., Kress A. 1973. Ultrastructural changes of oogenesis in some european amphibians II. *Triturus vulgaris*. Z Zellforsch, 143: 387-407
41. Srivastava A.S. 1948. Cytological observation on the oogenesis of certain indian lizards. II. Structure and function of the yolk nucleus in lacertilian eggs, Transactions of the American microscopical society, 67(4): 341-349
42. Sretarugsa P., Weerachatyanukul W., Chavadej J., Kruatrachue M., Sobhon P. 2001. Classification of developing oocytes, ovarian development and seasonal variation in *Rana tigerina*. Science Asia, 27: 1-14
43. Talaber I. 2008. Oogeneza pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodea, Proteidae). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani
44. Tokarz R. R. 1987. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In: The vertebrate ovary, comparative biology and evolution. Jones R.E. (ed.). New York and London, Plenum Press: 145-179
45. Voituron Y., Fraipont M., Issartel J., Guillaume O., Clobert J. 2010. Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): a challenge for ageing mechanisms. Biol. Lett. 1-3
46. Źelazowska M. 2010. Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae). Journal of Fish Biology, 76: 694-706
47. Źelazowska M., Kilarski W. 2009. Possible participation of mitochondria in lipid yolk formation in oocytes of paddlefish and sturgeon. Cell Tissue Res, 333: 585-591
48. Źelazowska M., Kilarski W., Bilinski S.M. Podder D.D., Kloc M. 2007. Balbiani cytoplasm in oocytes of a primitive fish, the sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, and its potential homology to the Balbiani body (mitochondrial cloud) of *Xenopus laevis* oocyte. Cell Tissue Res, 329, 1: 137-145

Ceket D. Ultrastruktura oogonijev in zgodnjih oocit v jajčniku močerila (*Proteus anguinus anguinus*).  
Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2011

---

49. Žibert U. 2010. Zoritev oocit v ovariju močerila (*Proteus anguinus anguinus*, Amphibia: Urodela, Proteidae). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani
50. Wood A. W., Van Der Kraak G. J. 2001. Apoptosis and ovarian function: Novel perspectives from the teleosts. Biology of reproduction, 64: 264-271

## 8.2 ELEKTRONSKI VIRI

1. Človeška ribica, Wikipedia, Prosta enciklopedija, [http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica), 20. 8. 2011