

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Lara HABIČ

**MORFOLOGIJA ATREZIJ V JAJČNIKU BELE
PODVRSTE MOČERILA**

Diplomsko delo
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Lara HABIČ

**MORFOLOGIJA ATREZIJE V JAJČNIKU BELE PODVRSTE
MOČERILA**

Diplomsko delo
Univerzitetni študij

**MORPHOLOGY OF ATRESIA IN OVARIES OF WHITE
SUBSPECIES OF OLM**

Graduation thesis
University studies

Ljubljana, 2012

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 imenovala prof. dr. Borisa Buloga in za somentorico as. dr. Lilijano Bizjak Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: doc. dr. Primož ZIDAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Somentorica: as. dr. Lilijana BIZJAK MALI
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 6.11.2012

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 verziji, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Lara Habič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 567/569:597.92(043.2)=163.6
KG folikularna atrezija/jajčnik/*Proteus anguinus anguinus*
AV HABIČ, Lara
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 2012
IN MORFOLOGIJA ATREZIJE V JAJČNIKU BELE PODVRSTE MOČERILA
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP IX, 45 str., 3 pregl., 19 sl., 31 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI S svetlobnim mikroskopom smo pregledali jajčnike dvajsetih samic bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Določili smo morfologijo in frekventnost atrezij (AT). AT smo našli v jajčnikih večine osebkov in so številčnejše v jajčnikih stradanih osebkov. Oociti, ki degenerirajo so vitelogeni, bodisi III. ali pa IV. zrelostne faze. Degeneracija folikla poteka v treh stopnjah (zgodnja, vmesna in napredna stopnja degeneracije). Za zgodnjo stopnjo degeneracije je značilna spremenjena citoplazma oocita ter pomnožene in povečane folikularne celice, ki postopoma vdrejo v citoplazmo oocita in prično s prebavo le-te. V vmesni fazi degeneracije je citoplazma oocita prebavljena, fagocitne folikularne celice zapolnijo folikel. Z napredovanjem procesa degeneracije se pigmentiranost in ožiljenost folikla stopnjuje, velikost AT pa se postopno zmanjšuje. AT pozne faze so manjše in izrazito pigmentirane. Pigmentni skupki v vezivni steni jajčnika so najverjetneje rezidualni preostanek AT. Atrezije z amorfnim materialom so faza regresije folikla.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC 567/569:597.92(043.2)=163.6
CX follicular atresia/ovary/*Proteus anguinus anguinus*
AU HABIČ, Lara
AA BULOG, Boris (supervisor)/BIZJAK MALI, Lilijana (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
PY 2012
TI MORPHOLOGY OF ATRESIA IN OVARIES OF WHITE SUBSPECIES OF OLM
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 45 p., 3 tab., 19 fig., 31 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The ovaries of 20 female of a white subspecies of olm (*Proteus anguinus anguinus*) were examined by light microscope. The morphology and frequency and of follicular atresia (AT) in the ovaries was determined. AT were found in the majority of the ovaries and they are more frequent in ovaries of starved specimens. Oocytes that degenerate are vitellogenic (phase III and IV). The follicle degeneration occurs in three stages – early, intermediate and late. In early stage of AT the oocyte's cytoplasm becomes altered, the follicle cells start to proliferate and hypertrophy, they also become phagocytic. Phagocytic cells gradually invade the cytoplasm of oocyte and digest it until the entire volume of the follicle is filled with them (intermediate stage). With the progression of degeneration process, the pigmentation is intensified and the volume of follicles is gradually reduced. AT of the late stage are smaller and intense pigmented. Pigment clusters in the connective tissue of the ovary may be the residue of AT. Atresia out of an amorphous material is the regression phase of the follicle.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 JAJČNIK MOČERILA	2
2.2 ATREZIJE V JAJČNIKIH VRETENČARJEV	3
2.2.1 Dejavniki za nastanek atrezij	4
2.2.2 Endokrina vloga atrezij	5
2.3 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI ATREZIJE PRI DVOŽIVKAH.....	5
3 MATERIAL IN METODE	7
3.1 MATERIAL	7
3.2 METODE	8
3.2.1 Priprava vzorcev za histologijo	8
3.2.1.1 Histološka barvanja parafinskih rezin	8
3.2.1.1.1 Hematoksilin-eozin barvanje (H&E).....	8
3.2.1.1.2 Selektivno trikromno barvanje po Massonu za dokazovanje kolagena.....	9
3.2.1.1.3 Barvanje Masson-Fontana za dokazovanje melanina.....	9
3.2.1.1.4 Indofenolna metoda za barvanje lipofuscina	9
3.2.1.1.5 Feulgen barvanje dednega materiala	10
3.2.1.1.6 PAS reakcija	10
3.2.2 Mikroskopiranje in analiza histoloških rezin	10
4 REZULTATI.....	12
4.1 ANATOMSKI IZGLED ATRETIČNIH FOLIKLOV	12
4.2 HISTOLOŠKE ZNAČILNOSTI ATRETIČNIH FOLIKLOV	13
4.2.1 Atretični folikli oocitov III (AT-OIII).....	15
4.2.1.1 Normalen folikel oocita III	15
4.2.1.2 Zgodnja (A) stopnja AT-OIII	15

4.2.1.3 Vmesna (B) stopnja degeneracije AT-OIII	19
4.2.1.4 Pozna (C) stopnja degeneracije AT-OIII	22
4.2.2 Atretični folikli oocitov IV (AT-OIV)	23
4.2.2.1 Normalen folikel oocita IV	23
4.2.2.2 Zgodnja stopnja degeneracije AT-OIV	23
4.2.2.3 Vmesna stopnja degeneracije AT-OIV	23
4.2.2.4 Napredna – pozna stopnja degeneracije AT-OIV	24
4.2.3 Atretični folikli v fazi regresije (AT-R)	30
4.3 PIGMENTNI SKUPKI V VEZIVNI STENI JAJČNIKA	31
4.4 ZASTOPANOST ATREZIJ V JAJČNIKU MOČERILA	33
5 DISKUSIJA	35
5.1 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI ATRETIČNIH FOLIKLOV	35
5.1.1 Atretični folikli oocitov III (AT-OIII)	36
5.1.2 Atretični folikli oocitov IV (AT-OIV)	36
5.1.3 Atretični folikli v fazi regresije (AT-R)	37
5.2 PIGMENTIRANOST ATRETIČNEGA FOLIKLA IN PIGMENTNI SKUPKI V STENI JAJČNIKA	37
5.3 APOPTOZA V ATRETIČNIH FOLIKLIH	38
5.4 VPLIV STRADANJA NA ZASTOPANOST ATRETIČNIH FOLIKLOV V JAJČNIKU	39
6 SKLEPI	40
7 POVZETEK	41
8 VIRI	43
8.1 Citirani viri	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o poskusnih živalih.....	7
Preglednica 2: Glavne značilnosti atretičnih foliklov (AT).....	14
Preglednica 3: Atrezije v jajčniku močerila (<i>Proteus anguinus anguinus</i>).....	34

KAZALO SLIK

Slika 1. Jajčnik močerila.	2
Slika 2a-c. Atretični folikli v jajčniku močerila.	12
Slika 3. Normalen folikel z oocitom III (OIII)..	15
Slika 4a-e. Atretični folikel oocita III. Zgodnja stopnja (A) degeneracije.	16
Slika 5a-f. Atretični folikel oocita III. Zgodnja stopnja (A) degeneracije.	17
Slika 6a-b. Atretični folikel oocita III. Zgodnja stopnja (A) degeneracije.	18
Slika 7a-d. Atretični folikel oocita III. Vmesna (B) stopnja degeneracije.	19
Slika 8a-f. Atretični folikel oocita III. Vmesna (B) stopnja degeneracije.	20
Slika 9a-f. Atretični folikel oocita III. Vmesna (B) stopnja degeneracije.	21
Slika 10a-c. Atretični folikli oocitov III. Pozna (C) stopnja degeneracije.	22
Slika 11a-b. Jajčni folikli.	23
Slika 12. Atretični folikli oocitov IV. Zgodnja stopnja degeneracije folikla.	25
Slika 13a-c. Atretični folikli oocitov IV. Zgodnja stopnja degeneracije.	26
Slika 14. Atretični folikli oocitov IV. Zgodnja stopnja degeneracije.	27
Slika 15a-f. Atretični folikli oocitov IV. Vmesna stopnja degeneracije.	28
Slika 16a-c. Atretični folikli oocitov IV. Napredna-pozna stopnja degeneracije.	29
Slika 17a-c. Atretični folikli v fazi regresije.	30
Slika 18a-b. Jajčnik močerila s pigmentnimi skupki.	31
Slika 19a-d. Pigmentni skupki v vezivni steni jajčnika.	32

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Cyt O – spremenjena citoplazma oocita

E – eritrociti

F – fagociti

Fo – folikularne celice

L – lumen folikla

P – celice s pigmentom

RP – rumenjakove ploščice

Vt – vezivna teka

VT – vezivno tkivo

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Oogeneza je pri beli podvrsti močerila (*Proteus anguinus anguinus*) v nekaterih segmentih že raziskana. Opisana je morfologija jajčnika, določene in opisane so zoritvene faze jajčnih celic, opisana je ultrastruktura oogonijev in previtelogenih oocitov (Talaber, 2008; Žibert, 2010; Bizjak Mali in Bulog, 2010; Ceket, 2011). Zoritev jajčnih celic pri močerilu ni sezonska (Talaber, 2008; Žibert, 2010). Samica lahko odlaga jajca kadarkoli tekom leta, preferenca odlaganja jajčec pa je zimsko obdobje, od oktobra do marca (Juberthie in sod., 1996).

Predhodne raziskave morfologije jajčnika močerila so razkrile prisotnost atretičnih foliklov ali atrezij (Žibert, 2010; Bizjak Mali in Bulog, 2011), ni pa poznano katere zoritvene faze oocitov so atrezijam podvržene, kot tudi ne pogostost atrezij. Slabo poznana je tudi njihova morfologija.

Nastanek folikularne atrezije je široko razširjen degenerativen proces, ki se pojavlja v jajčnikih tako vretenčarjev kot nevretenčarjev. Pri tem oociti, ki so lahko v različnih stadijih razvoja in rasti, propadejo še pred ovulacijo (Guraya, 1989). Način degeneracije in morfologija atrezij se med vretenčarji razlikuje, vsem pa so skupne drastične spremembe tako v oocitih, kot tudi v somatskih celicah folikla. Pri oviparnih vretenčarjih so degeneraciji podvrženi predvsem vitelogeni oociti, njihovo degeneracijo pa povezujejo s ponovno uporabo proteinov skladiščenih v energijsko bogatem rumenjaku oocitov (Dumont, 1972). Atrezije pri ribah in dvoživkah so frekventnejše v jajčnih osebkih, ki so izpostavljeni različnim stresnim dejavnikom, med drugim tudi stradanju (Dumont, 1972; Matova in Cooley, 2001; Santos in sod., 2008; Ogielska in sod., 2010). Ti dejavniki lahko vplivajo na reprodukcijsko sposobnost osebka, ki je zaradi tega manj uspešna.

1.2 CILJI NALOGE

Z diplomskim delom dopolnjujemo rezultate predhodnih raziskav oogeneze močerila. Namen dela je opisati morfološke značilnosti atrezij, določiti zaporedne stopnje degeneracije foliklov in ugotoviti katere zrelostne faze oocitov so propadom podvržene. Zanima nas tudi, če so atrezije v jajčnikih stradanih osebkih številčnejše.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bo morfologija atrezij primerljiva s propadi opisanimi za dvoživke, da bodo atrezije zastopane predvsem v jajčnikih s starejšimi (vitelogenimi) fazami oocitov, ter da bo bodo atrezije številčnejše v jajčnikih stradanih osebkih.

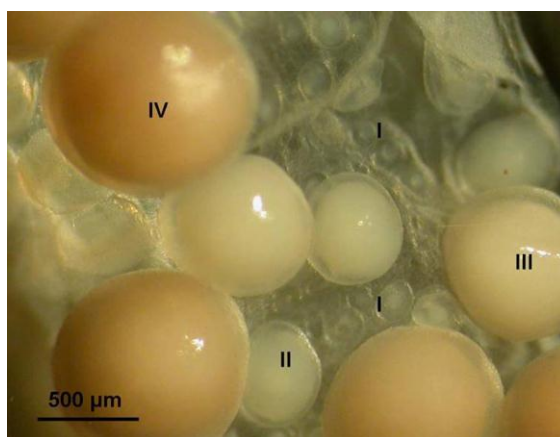
2 PREGLED OBJAV

Jajčniki dvoživk vsebujejo oogonije, ki v procesu oogeneze ustvarjajo nove generacije oocitov, ti pa vstopajo v proces zoritve in diferenciacije (Ogielska in Bartmanska, 2009). Oogeneza je pri dvoživkah kontinuiran proces v katerem primarni oogoniji pred vsakim paritvenim obdobjem prenavljajo klično linijo (Gilbert, 2003; Witschi, 1929, 1956, cit. po Ogielska in Bartmanska, 2009). Sledi dvo ali triletna akumulacija rumenjaka, prekursorjev RNK ter rast in dozorevanje celic vse do ovulacije. Ovulirane zrele jajčne celice nadomestijo previtelogeni oociti, ki prično z rastjo in nadaljno diferenciacijo, sočasno pa nastaja nova generacija oogonijev z intenzivnimi mitotskimi delitvami (Ogielska in Bartmanska, 2009).

2.1 JAJČNIK MOČERILA

Z raziskavami, v okviru katerih so bila izdelana tudi tri diplomska dela (Talaber, 2008; Žibert, 2010; Ceket, 2011), so se v zadnjih letih razkrile anatomske, morfološke in ultrastrukturne značilnosti jajčnih celic v jajčniku močerila. V spodnjem besedilu povzemamo bistvene rezultate.

Jajčnik močerila je votlega tipa in podolgovate oblike, kar se sklada z obliko telesa same živali. Je asinhroni tip jajčnika, saj so v jajčniku sočasno različne zoritvene faze oocitov. Opisanih je bilo pet zoritvenih faz oocitov: dve previtelogeni fazi (OI in OII) in tri vitelogene faze (OIII, OIV in OV).



Slika 1. Jajčnik močerila. I – IV: zoritvene faze oocitov. Posnetek s stereolupo.

Oogoniji so najmanjše jajčne celice v jajčniku močerila in merijo od 20 do 50 μm . So sferične oblike, z malo citoplazme, jedro je veliko, jedrca pa maloštevilna. Pogosto so v skupkih, redkeje posamično.

Previtelogeni oociti I in II so prevladujoč tip oocitov v jajčniku močerila. Oociti I merijo od 100 do 300 μm . Zanje je značilna prosojna citoplazma in homogena jedrna masa, jedro je veliko s številnimi jedrci. Oociti II so večji in merijo med 300 in 600 μm . Povečano je

število jedrc na jedrni periferiji. Citoplazma je sicer podobna tisti v oocitih I, vendar so v tej fazi jasno vidni različno veliki vezikli v robnem delu citoplazme.

Oociti III merijo od 600 do 1000 μm in so bele do rumenkasto mlečne barve. Čeprav v njihovi citoplazmi še ni vidnih rumenjakovih ploščic, so že vitelogeni oociti, saj v njih poteka proces privzema rumenjakovih proteinov v citoplazmo oocita.

Oociti IV so večji (1000 do 1700 μm) in enakomerno rjavo pigmentirani. V njih se že kopičijo rumenjakeve ploščice. Glede na količino in razporeditev rumenjakovih ploščic je ta zoritvena faza razdeljena na zgodnjo in pozno. V zgodnjih oocitih IV se rumenjakeve ploščice v citoplazmi oocita pojavijo kot tanek periferni obroč rumenjakovih ploščic, ki se potem postopoma razširi v središčno citoplazmo, kar je značilno za pozno fazo. Tako v oocitih III kot IV je citoplazma slojevita, v centralnem delu homogena, v kortikalnem delu pa polna lipidnih kapelj. Jedrca na periferiji jedra so večja kot v oocitih zgodnejših zoritvenih stopenj.

Citoplazma oocitov V je popolnoma zapolnjena z rumenjakovimi ploščicami, jedro pa je izrinjeno na periferijo. Oociti V so najstarejša zabeležena faza zoritve oocitov pri močerilu, niso pa končna. Zrele, preovulatorne faze oocitov, v do sedaj pregledanih jajčnikih močerila niso zasledili.

Vitelogeneza je proces skladiščenja rumenjakovih proteinov v citoplazmi jajčne celice (Gilbert, 2003). Rumenjakeve ploščice, ki pri tem nastanejo, predstavljajo zalogo aminokislin, ogljikovih hidratov, lipidov, fosfatov in ionov (Fagoto in Maxfield, 1994). So skladišče energije in strukturnih komponent za rast in razvoj embria (Patino in Sullivan, 2002).

Oociti močerila so obdani z enoskladnim epitelom folikularnih celic. Folikularni ovoj nastane v procesu folikulogeneze. Nastajati prične sočasno z vstopom oogonija v oogenezo in se zaključi, ko je oocit popolnoma obdan z ovojem prefolikularnih celic. Okoli oogonijev so sprva maloštevilne prefolikularne celice, ki tvorijo nesklenjen epitel, oocite I in II pa že obdaja enoskladen epitel folikularnih celic. Folikularni epitel obdaja tanka in ožiljena vezivna ovojnica ali teka. Skupaj oblikujeta steno folikla oocita. Med oocitom in folikularnim ovojem je vitelinska ovojnica, ki se oblikuje v oocitih III. Oocit z vsemi sloji ovoja folikla je jajčni folikel.

2.2 ATREZIJE V JAJČNIKIH VRETENČARJEV

Folikularne atrezije so široko razširjen degenerativen proces, ki se pojavljajo tako v jajčnikih vretenčarjev kot nevretenčarjev, pri katerem večina oocitov, v različnih stadijih razvoja in rasti, propade še pred ovulacijo (Guraya, 1989). Pri oviparnih vretenčarjih so degeneraciji izpostavljeni predvsem vitelogeni oociti (Guraya, 1989; Ogielska in Bartmanska, 2009). Nastanek in razvoj atrezije spremljajo jasno vidne morfološke, histokemijske in biokemijske spremembe vseh sestavnih delov folikla (Guraya, 1989).

Ogielska in Bartmanska (2009) navajata, da so atrezije v jajčnikih dvoživk specifičen fiziološki intraovarijski način prebave degenerirajočega oocita s strani folikularnih celic, ki proliferirajo, hipertrofirajo in postanejo fagocitozne.

Zakaj določen folikel v jajčniku dozori, sosednji folikel pa degenerira in propade je še vedno uganka. Kot tudi, zakaj je folikularni epitel določenega oocita stimuliran, da gre v proces mitoze, rasti in diferenciacije, celice drugega enakega folikla pa niso stimulirane.

Degeneracija jajčnih foliklov je pri vretenčarjih rezultat programirane celične smrti, v glavnem apoptoze (Matova in Cooley, 2001). Programirana celična smrt je genetsko reguliran aktiven proces, nujen za vzdrževanje homeostaze tkiv v vseh mnogoceličnih organizmih, pri katerem gredo vse v nadaljnjih fazah nerabljene celice v proces samouničenja z aktivacijo notranjega programa za propad (Kerr in sod., 1972 cit. po Santos in sod., 2008). Mehanizem apoptoze se medvrstno ne razlikuje in najverjetneje vključuje enake molekule, ki usmerjajo smrt somatskih celic (Matova in Cooley, 2001). Apoptoza ali programirana celična smrt tipa I prizadene posamezne celice. Integriteta okolnih celic se vzdržuje z razbitjem propadajoče celice na manjša apoptotična telesa. Zdrave sosednje celice ali fagociti nato prebavijo prej oblikovana apoptotična telesa in s tem preprečijo vnetje (Huettenbrenner in sod., 2003; Santos in sod., 2008). Ključno vlogo pri apoptozi imajo proteolitični encimi kaspaze, ki aktivirajo $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -odvisne endonukleaze, te pa fragmentirajo DNK. Pri avtofagni ali programirani celični smrti tipa II se citoplazma in celični organeli obdajo z membrano in se združijo z lizosomi, kar rezultira v nastanku avtofagnih vakuol (Huettenbrenner in sod., 2003). Pri tem tipu celične smrti, za katero so sprva mislili, da se pojavlja predvsem v jajčnikih žuželk, sodelujejo kathepsini ali proteosomalni proteini. Santos in sodelavci (2008) so dokazali, da je avtofagija zastopana tudi pri procesu folikularnih atrezij v jajčnikih kostnic. Folikularne celice so namreč ključne pri proteolizi in resorpciji rumenjaka oocita. Apoptoza je zastopana šele v poznih fazah folikularne atrezije, ko je rumenjaka že prebavljen.

2.2.1 Dejavniki za nastanek atrezij

Guraya (1989) kot dejavnike, ki vplivajo na nastanek atrezij (predvsem pri sesalcih), omenja starost, reproduktivni cikel, brejost, laktacijo, hormone, prehrano, radiacijo z X-žarki in druge. Pri kostnicah so folikularne atrezije rezultat tako naravnih dejavnikov, kot tudi spremenjenih pogojev v ujetništvu. Porast atrezij opisujejo pri ribah izpostavljenih stresu iz okolja, katerega rezultat je manj uspešna reprodukcija osebka (Janž in sod., 2001; Sato in sod., 2005; Drevnick in sod., 2006). Pri cebricah (*Danio rerio*) kot vplivna dejavnika za nastanek atretičnih foliklov izpostavljajo spremembe v slanosti vode in onesnaževanje (Isisag Ucuncu in Cakici, 2009). Linares-Casenave in sodelavci. (2002) so dokazali, da izpostavitve samic belega jesetra (*Acipenser transmontanus*) povišani temperaturi vode izzove nastanek preovulatornih folikularnih atrezij in s tem neuspeh dokončanja razmnoževalnega cikla.

Ogielska s sodelavci (2010) opisuje degeneracijo oocitov pri dvoživkah kot odziv organizma samice na različen stres, kot je poraba maščobnih rezerv, dolgotrajno ujetništvo, spremenjeni temperaturni pogoji, stradanje, obrnjen svetlobni režim ter vpliv prenatrpanosti v ujetništvu.

2.2.2 Endokrina vloga atrezij

Pri vretenčarjih se iz postovulatornih foliklov in/ali atretičnih foliklov oblikuje corpus luteum z začasno endokrino vlogo (Beyo in sod., 2010). Corpus luteum producira predvsem progesteron, njegov nastanek je pri sesalcih vezan na viviparnost, pri ostalih oviparnih vretenčarjih, vključno z dvoživkami, ima vlogo zadrževanja jajc v jajcevodu (Beyo in sod., 2010), regulira tudi število ovuliranih jajčec (Uribe Aranzabal, 2003). Mnenja glede endokrine vloge preovulatornega corpus luteuma, za katerega uporabljajo tudi izraz *corpora atretica*, so pri dvoživkah razhajajoča. Nekateri avtorji so mnenja, da je vpleten v produkcijo in sekrecijo steroidnih hormonov (Perry in Rowlands, 1962 cit. po Ogielska, 2010), drugi endokrino vlogo zanikajo (Jorgensen, 1992 cit. po Ogielska in sod., 2010; Guraya, 1989; Ogielska in sod., 2010). Endokrina vloga je bila pri dvoživkah potrjena pri viviparnih sleporilih (Exbrayat, 2009; Beyo, 2010).

2.3 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI ATREZIJE PRI DVOŽIVKAH

Degeneracija foliklov pri spolno zrelih dvoživkah je bila opisana tako pri brezrepcih, repatih dvoživkah kakor tudi sleporilih (Uribe Aranzabal, 2003; Exbrayat, 2009; Ogielska in sod., 2010). Morfološke značilnosti degenerirajočih oocitov je prvi opisal Guraya leta 1969 (cit. po Ogielska in sod., 2010) pri odrasli samici vrste *Bufo stomaticus*.

Podrobnejši opis atrezije pri brezrepcih podajajo Ogielska in sodelavci (2010). Proučevali so jo pri treh vrstah žab (*Rana temporaria*, *Rana lessonae*, *Rana ridibunda*). Atrezije so glede na morfološki izgled razdelili v tri glavne tipe – tip I, tip II in tip III.

- Atrezija tipa I

Atrezija tipa I je najpogosteje zastopan tip degeneracije in je značilen za vitelogene oocite. V atreziji tipa I se folikularne celice pomnožijo (proliferirajo), povečajo (hipertrofirajo), postanejo fagocitotone in prebavijo vitelogeni oocit. Poteka v štirih stopnjah (A-D).

Stopnja A: Jedro oocita se skrči, jedrca se zlijejo v večje agregate. Razpadu vitelinske membrane sledi proliferacija in hipertrofija folikularnih celic, ki nato vdrejo v citoplazmo oocita ter fagocitirajo rumenjake ploščice in samo citoplazmo.

Stopnja B: Zapolnjevanje folikla s pomnoženimi folikularnimi celicami ali fagociti. Zunanje celice folikularnega ovoja ostajajo nespremenjene. V predelih folikla, kjer je citoplazma oocita že fagocitirana, se fagociti povečajo in akumulirajo temen pigment. Ko tudi fagociti propadejo, se mestoma pojavijo prazni prostori, ki so običajno v centru folikla.

Stopnja C: Hkrati z degeneracijo oocitov se folikli krčijo in ostajajo zapolnjeni s fagocitotnimi celicami, ki vključujejo temen pigment. Vezivna ovojnica se izrazito ožili.

Stopnja D: To je končni stadij degeneracije tipa I. V foliklu je kondenziran črn pigment. Vezivna ovojnica ali teka folikla je nagubana in zadebeljena. Folikel je bogato ožiljen. Volumen folikla se močno zmanjša.

- Atrezija tipa II

Atrezija tipa II se prav tako pojavlja pri vitelogenih oocitih. Za ta tip degeneracije je značilna disperzija citoplazme oocita med sosednje folikle in vključuje ostanke germinalnega vezikla. V citoplazmi oocita so lahko zastopani tudi skupki fagocitov.

- Atrezija tipa III

Atrezija tipa III je značilna za previtelogene oocite in zgodnje vitelogene folikle. Folikularne celice ne vdrejo v citoplazmo oocita. Jedrca se zlijejo, volumen germinalnega vezikla se skrči, citoplazma pa kondenzira in fragmentira.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Raziskavo smo naredili na jajčnikih dvajsetih samic bele podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus*. Uporabili smo izključno fiksirana tkiva iz arhivske zbirke tkiv skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

Osebki v našem vzorcu so bile spolno zrele samice s telesno dolžino od 18 do 29 cm in telesno težo od 9,05 do 33,4 g (Preglednica 1). Trinajst osebkov je bilo ujetih v Planinski jami, trije v Otoškem bregu, dva v Grčarskih ravneh in po eden v izviru Zibrščice pri Dobrniču, Kompoljski jami in v izviru Krupe. Vse živali so bile do žrtvovanja vzdrževane v speleobiološkem laboratoriju na Oddelku za Biologijo Biotehniške fakultete, v akvarijih z vodnimi filtrirnimi črpalkami, pri temperaturi 10 °C in v stalni temi. Vsi, razen šestih osebkov, so bili hranjeni enkrat tedensko s postranicami (Crustacea: Amphipoda). Šest osebkov je bilo v poskusu stradanja (Preglednica 1), od tega sta bila dva (P132 in P171) stradana en mesec, eden (P137) štiri mesece in trije (P147, P176, P177) štirinajst do osemnajst mesecev.

Preglednica 1: Podatki o poskusnih živalih.

Evidenčna številka osebkov	Lokaliteta	Datum fiksacije	Dolžina osebkov (mm)	Masa živali (g)
P131	Planinska jama	15.12.1998	250	/
P132* ¹	Planinska jama	21.1.1999	226	/
P137* ²	Planinska jama	14.4.1999	222	/
P145	Planinska jama	18.10.1999	262	22,00
P147* ³	Planinska jama	12.4.2000	270	18,80
P150	Otoški breg	27.10.2000	280	33,00
P151	Otoški breg	27.10.2000	240	15,50
P152	Kompoljska jama	30.1.2001	260	16,90
P157	Otoški breg	15.11.2001	285	33,40
P162	Planinska jama	5.8.2003	232	22,87
P163	Planinska jama	18.8.2003	246	22,37
P165	Planinska jama	21.8.2003	270	23,35
P168	Planinska jama	26.11.2003	257	21,69
P169	Planinska jama	26.11.2003	243	19,95
P171* ³	Planinska jama	1.12.2004	235	16,44
P176* ³	Planinska jama	28.1.2005	243	15,30
P177* ¹	Planinska jama	19.5.2005	250	11,40
P181	Grčarske ravne	6.12.2005	223	13,33
P182	Grčarske ravne	23.1.2006	275	27,36
P189	Izvir Krupe	12.7.2007	226	16,50

* stradani osebki:

¹ : Osebkov, ki je stradana 1 mesec.

² : Osebkov, ki je stradana 4 mesece.

³ : Osebki, ki so stradani 14 do 18 mesecev.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev za histologijo

Vzorci jajčnikov večine osebkov so bili že vklopljeni v parafin in zrezani na histološke rezine debeline od 5-12 μm , vsaka tretja do peta rezina je bila tudi že barvana (v večini) s hematoksilin-eozin tehniko. Pod svetlobnim mikroskopom smo pregledali vse že barvane histološke rezine vsakega osebka. Z namenom dokazovanja zelenih struktur in boljšega pregleda smo po potrebi pri vsakem od osebkov izbrali dodatna stekelca z rezinami in jih barvali z ostalimi načini histoloških barvanj.

Jajčniki treh osebkov so bili le fiksirani v različnih fiksativih (10% formalin, Bouin, Carnoy) in dehidrirani v rastoči alkoholni vrsti do 70% etanola. Te vzorce jajčnikov smo dehidrirali v 96% in 100% etanolu, trikrat po 15 minut. Sledilo je bistrenje v ksilenu dvakrat po 15 min in infiltracija v parafin (Paraplast Plus, Kendall, ZDA), z dvema menjavama (prvič 4 ure, drugič 12 ur).

Parafinske vzorce smo rezali na 9 – 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 ugotavljamo 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 potrebno pred barvanjem iz rezin odstraniti hidrofobni parafin in jih ponovno hidrirati. Parafin smo odstranili s ksilenom (2-krat po 3 min), rezine nato prenesli v propanol (2-krat po 3 min) ter jih hidrirali preko padajoče etanolne vrste (96% in 70% etanol; v vsakem 2-krat po 3 min) do destilirane vode. Sledilo je barvanje z različnimi barvili, nato dehidriracija v 70% in 96% etanolu (v vsakem 2-krat po nekaj sekund), namakanje v propanolu (2-krat po nekaj sekund) in nato še v ksilenu (2-krat po nekaj sekund ali dlje). Na objektna stekla smo kanili kapljico sintetične smole (Pertex®, Medite GmbH, Nemčija) in jih prekrili s krovnimi stekelci.

3.2.1.1.1 Hematoksilin-eozin barvanje (H&E)

Weigertov železov hematoksilin, eozin in solno-kisli alkohol smo pripravili po navodilih opisanih v Presnell in sodelavci (1997).

Po deparafinizaciji in rehidraciji smo s hematoksilinom vzorce barvali 2 minuti, sledilo je spiranje pod tekočo vodo. Nato smo rezine za eno minuto prelili s solno kislim alkoholom in jih sprali z destilirano vodo. Sledilo je barvanje z eozinom za dve minuti. Odvečno barvilo smo odstranili s 70% alkoholom ter sprali z destilirano vodo.

Rezultat barvanja so modrovijolična do modra jedra in rožnata citoplazma (povzeto po Presnell in sod., 1997).

3.2.1.1.2 Selektivno trikromno barvanje po Massonu za dokazovanje kolagena

Weigertov železov hematoksilin smo pripravili po navodilih opisanih v Presnell in sodelavci (1997).

Vzorci smo potopili za dve minuti v Weigertov železov hematoksilin in jih nato sprali z vodovodno vodo. Z 1% očetno kislino smo vzorce diferencirali, sprali z vodovodno vodo ter barvali z mešanico raztopine A¹ in B² v razmerju 1:2 za 3 minute. Po spiranju z destilirano vodo smo stekelca prelili z 1% fosfomolibdensko kislino, ki razbarva vezivna vlakna. Kislino smo odlili s stekelca in jih potopili v raztopino C, ter stresali 30 sekund, da sta se raztopina C³ in fosfomolibdenska kislina premešali. Po spiranju z destilirano vodo smo objektna stekla prelili še z 1% očetno kislino za 15 do 30 sekund.

Rezultat barvanja so temna modro-črna jedra, rožnata citoplazma, rdeči eritrociti in modra kolagenska vlakna (povzeto po Presnell in sod., 1997).

3.2.1.1.3 Barvanje Masson-Fontana za dokazovanje melanina

Lugolno raztopino (Gram iodinin) in Fontana raztopino smo pripravili po navodilih opisanih v Presnell in sodelavci (1997).

Po deparafinitzaciji in rehidraciji smo del objektnih stekel tretirali z 10% vodikovim peroksidom za 24 oz. 48 ur, da smo razbarvali melanin. Ti razbarvani vzorci so bili negativna kontrola.

Sledilo je 10 minutno namakanje v Lugolni raztopini in 3 minutno spiranje pod tekočo vodovodno vodo. S 5% natrijevim tiosulfatom smo vzorce razbarvali (2 min) in jih nato 4 min spirali pod tekočo vodovodno vodo. Čez noč oz. za 18 do 48 ur smo vzorce pri sobni temperaturi in v temnem prostoru potopili v Fontana raztopino. Vzorce smo nato dobro sprali z destilirano vodo in jih za 3 minute prelili z 0,2% AuCl, sprali z destilirano vodo ter 2 min namakali v natrijevem tiosulfatu in jih 5 min spirali pod tekočo vodovodno vodo. Vzorce smo 5 min kontrastirali z 0,1% safraninom.

Rezultat barvanja so močno črne melaninske granule, jedra in drugi deli tkiv so rdeči. Pri kontrolnih negativnih vzorcih je melanin razbarvan (povzeto po Presnell in sod., 1997).

3.2.1.1.4 Indofenolna metoda za barvanje lipofuscina

Pred barvanjem smo pripravili svežo raztopino indofenola iz 0,1 g natrijevega 2,6-dikloroindofenolat hidrata in 100 ml 50% alkohola, jo premešali na magnetnem mešalniku, raztopino filtrirali in s pH-metrom umerili pH na 2.0. Po deparafinizaciji in rehidraciji smo

¹ Raztopina A: 1 g kislega fuksina, 100 ml destilirane vode in 1 ml koncentrirane očetne kisline.

² Raztopina B: 1 g barvila ponceau de xyloidine, 100 ml destilirane vode in 1 ml koncentrirane očetne kisline.

³ Raztopina C: 2,5 g anilinskega modrila, 100 ml destilirane vode in 2,5 ml koncentrirane očetne kisline.

Pri vseh treh raztopinah smo zavreli vodo, dodali barvilo, odstavili in v vročo mešanico dodali kislino in vse skupaj ohladili v dobro zaprti posodi.

vzorci na sobni temperaturi 5 min barvali z indofenolom, jih nato nekajkrat potopili v vodovodno vodo, da se je odvečno barvilo spralo in nanje kanili glicerinsko želatino ter jih prekrili.

Rezultat barvanja je oranžno-rdeč lipofuscin in modri eritrociti (povzeto po Presnell in sod., 1997).

3.2.1.1.5 Feulgen barvanje dednega materiala

Schiffov reagent smo pripravili po navodilih opisanih v Presnell in sodelavci (1997).

SO₂-vodo smo pripravili iz 1 ml 5M HCl, 0,5 g kalijevega tiosulfata (K₂S₂O₅) in 99 ml destilirane vode.

Deparafinizaciji in rehidraciji parafinskih rezin je sledila eno urna hidroliza s 5M HCl na sobni temperaturi. Nato smo vzorce za pet minut prestavili v destilirano vodo, ki je imela temperaturo 4°C. Vzorce smo nato prestavili v Schiffov reagent za 2 uri, pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje v SO₂-vodi in sicer trikrat po 2 min, dvakrat po 10 min in v zadnji stopnji 20 min. Preparate smo dehidrirali v alkoholni vrsti in jih zbistrili v ksilenu in pokrili.

DNA se s Feulgenovo reakcijo barva kvantitativno. Uporabili smo prilagojen postopek po Kladniku (2003). Pod svetlobnim mikroskopom je viden le dedni material celic, ki je obarvan vijolično.

3.2.1.1.6 PAS reakcija

Schiffov reagent, Mayerjev hematoksilin in Scott raztopino smo pripravili po navodilih opisanih v Presnell in sodelavci (1997).

Po deparafinizaciji in rehidraciji smo vzorce 15 min oksidirali z 0,5% periodno kislino, jih nato sprali z destilirano vodo in 10 min inkubirali v Schiffovem reagentu. Rezine smo 20 min spirali pod tekočo vodovodno vodo, dokler niso pordečile in jih nato za 2 min potopili v Mayerjev hematoksilin, ki obarva jedra. Sledilo je spiranje z destilirano vodo. Na koncu smo za 5 sekund preparate pomočili v Scott raztopino in jih sprali z vročo vodovodno vodo, jedra tako bolj pomodrijo. Preparate smo dehidrirali v 96% alkoholu, zbistrili v ksilenu in prekrili.

Rezultat so modra jedra, glikogen se obarva rdeče-vijolično (povzeto po Presnell in sod., 1997).

3.2.2 Mikroskopiranje in analiza histoloških rezin

Histološke preparate smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom OPTON – Axioskop Zeiss in jih fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500 in z digitalno kamero Leica DFC290 H. Fotografije smo opremili z računalniškima programoma Leica Application Suite in Adobe Photoshop CS 5.

Pri vsakem od osebkov je bil zrezan le del jajčnika. Od velikosti zrezanega vzorca jajčnika je odvisno število objektivnih stekel s histološkimi rezinami. Pri nobenem od osebkov ni bilo

manj kot 20 objektnih stekel. Na vsakem objektnem steklu je bilo od štiri do šest histoloških rezin. Pregledali smo vsako zaporedno rezino. Na histoloških rezinah vsakega petega zaporednega objektnega stekla smo atrezije tudi prešteli. Pregledali smo povprečno 120 histoloških rezin vsakega jajčnika.

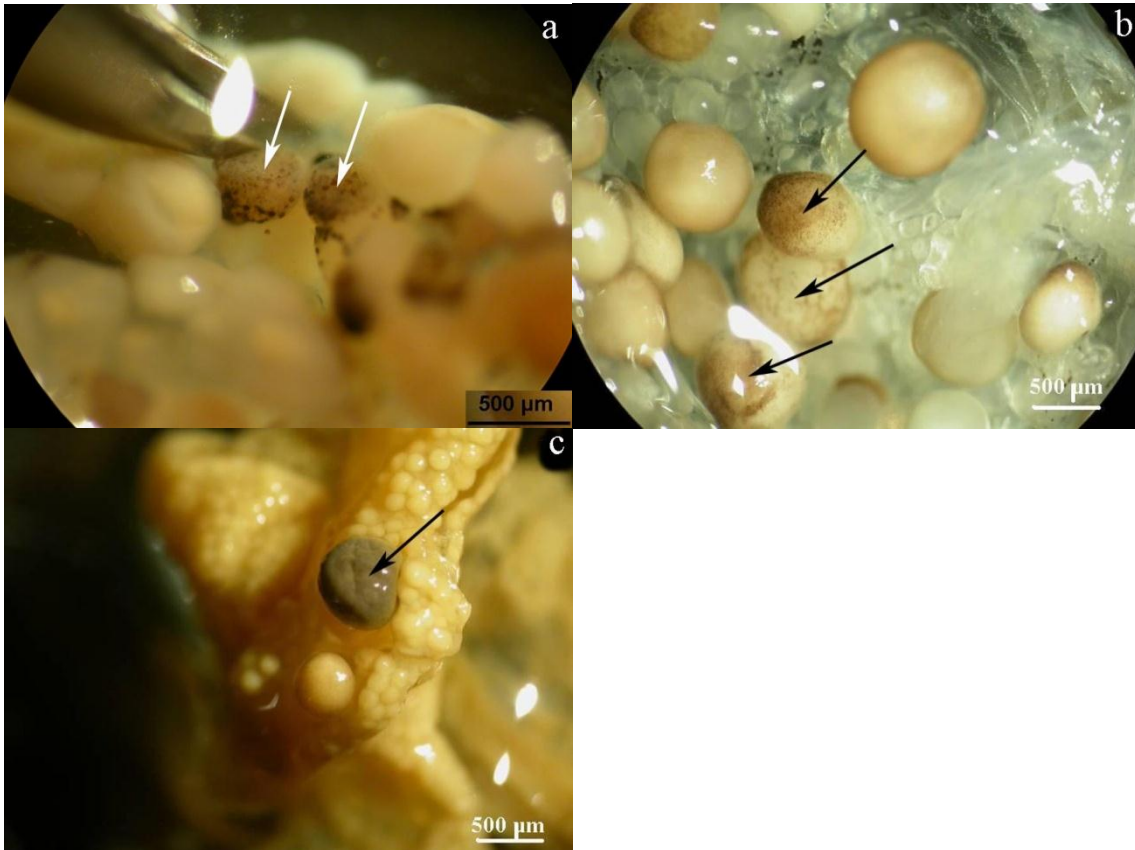
Zrelost jajčnika osebkov smo povzeli po Žibert (2010), kjer so zrelost jajčnika določili z najstarejšo zoritveno fazo oocitov v jajčniku.

Preglednice vključene v diplomsko nalogo so bile oblikovane v Microsoft Word-u.

4 REZULTATI

4.1 ANATOMSKI IZGLED ATRETIČNIH FOLIKLOV

Atretični folikli so okroglih do nepravilnih oblik in različnih velikosti, s premerom od 300 do 1000 μm (sl. 2a-c). Od oocitov se razlikujejo po marmoriranem izgledu, nekateri so lahko tudi popolnoma temni, rjavo-črni.



Slika 2a-c. Atretični folikli (puščice) v jajčniku močerila. Lahko so marmoriranega videza (sl. a, b) ali temno pigmentirane (sl. c). Posnetek s stereolupo.

4.2 HISTOLOŠKE ZNAČILNOSTI ATRETIČNIH FOLIKLOV

Tako izgled kot tudi velikost atretičnih foliklov sta pri močerilu na histoloških rezinah zelo raznolika, saj so atretični folikli na različnih stopnjah procesa degeneracije in oociti, ki so v procesu degeneracije, različnih zoritvenih faz.

Pri določanju stopenj procesa degeneracije foliklov smo se oprli na opis atrezij pri brezrepcih (Ogielska in sod., 2010).

Ključne značilnosti, na katere smo bili pozorni so: zoritvena faza propadajočega oocita, velikost folikla, spremembe folikularnega ovoja (folikularni epitel in vezivni ovoj), pigmentiranost in ožiljenost folikla.

Atretične folikle smo razdelili na:

- atretične folikle oocitov III (AT-OIII), ker vključujejo degenerirajoči oocit III
- atretične folikle oocitov IV (AT-OIV), ker vključujejo degenerirajoči oocit IV
- atretične folikle v fazi regresije (AT-R), ker vključujejo amorfen hialini material.

Pri določanju zoritvene faze propadajočega oocita smo bili pozorni na velikost folikla ter na zastopanost rumenjakovih ploščic v citoplazmi oocita.

Atretični folikli so bili na različnih stopnjah degeneracije, ki smo jih razdelili na:

- zgodnjo ali A stopnjo degeneracije,
- vmesno ali B stopnjo degeneracije,
- pozno ali C stopnjo degeneracije
- in napredno – pozno v primeru AT-OIV

V preglednici 2 so zbrane glavne morfološke značilnosti AT in posameznih stopenj degeneracije.

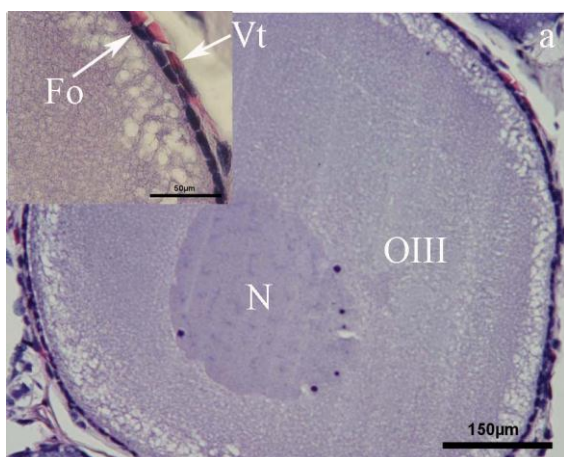
Preglednica 2: Glavne značilnosti atretičnih foliklov (AT) pri močerilu (*Proteus anguinus anguinus*).

Morfološka oblika AT	Glavne značilnosti posamezne stopnje	
AT-OIII	zgodnja (A)	Spremenjena citoplazma, proliferacija in hipertrofija celic folikularnega epitela, ki postanejo fagocitozne in vdrejo v citoplazmo oocita.
	vmesna (B)	Postopno zapolnjevanje folikla s spremenjenimi celicami folikularnega epitela ali fagociti, ki prebavijo citoplazmo, nastajanje lumnov, izrazito ožiljenje folikla.
	pozna (C)	Postopno zmanjšanje in izrazita pigmentiranost folikla.
AT-OIV	zgodnja	Citoplazma je zapolnjena z rumenjakovimi ploščicami, celice folikularnega epitela so rahlo povečane in urejene v enem sloju, vdor spremenjenih celic folikularnega epitela ali fagocitov v citoplazmo oocita je izrazitejši v pecljatem delu folikla.
	vmesna	Citoplazma oocita je skoraj v celoti prebavljena, v foliklu so razpršene fagocitne celice in manjši lumni, vezivna teka je ožiljena.
	napredna-pozna	Folikle skoraj v celoti zapolnjujejo celice vezivne ovojnice ali teke, v centru folikla so fagociti, ki prebavljajo preostanek rumenjakovih ploščic.
AT-R	faza regresije	Folikli so zapolnjeni z amorfnim hialinim materialom, osrednji del folikla lahko vključuje lumen s pigmentnimi celicami, folikel je dobro ožiljen.

4.2.1 Atretični folikli oocitov III (AT-OIII)

4.2.1.1 Normalen folikel oocita III

Stena normalnega folikla oocita III je iz enega sloja folikularnih celic, ki obdajajo oocit in tanke vezivne ovojnice ali vezivne teke na zunanjem obodu folikla (sl. 3). Oocit obdaja vitelinska ovojnica, ki je med oocitom in folikularnim epitelom. V citoplazmi oocita III še ni rumenjakovih ploščic, v robnem delu citoplazme so maščobne kaplje, ki se pri fiksaciji niso ohranile. V jedru so jedrca in krtačasti kromosomi.



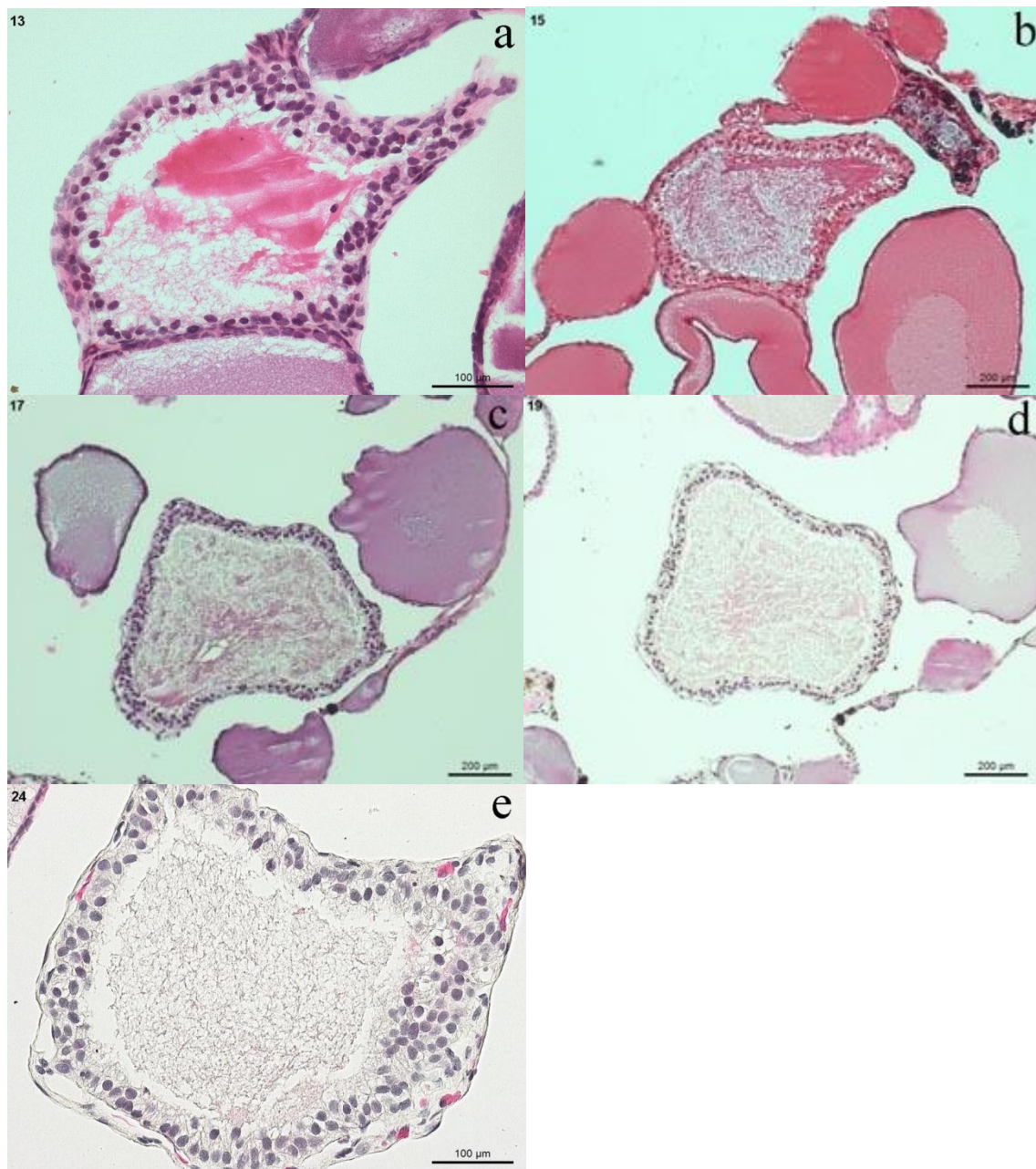
Slika 3. Normalen folikel z oocitom III (OIII). Stena folikla je iz sloja sploščenih folikularnih celic (Fo), ki ga obdaja tanka vezivna teka (Vt); N, jedro s krtačastimi kromosomi in jedrci. Barvanje: H&E.

4.2.1.2 Zgodnja (A) stopnja degeneracije AT-OIII

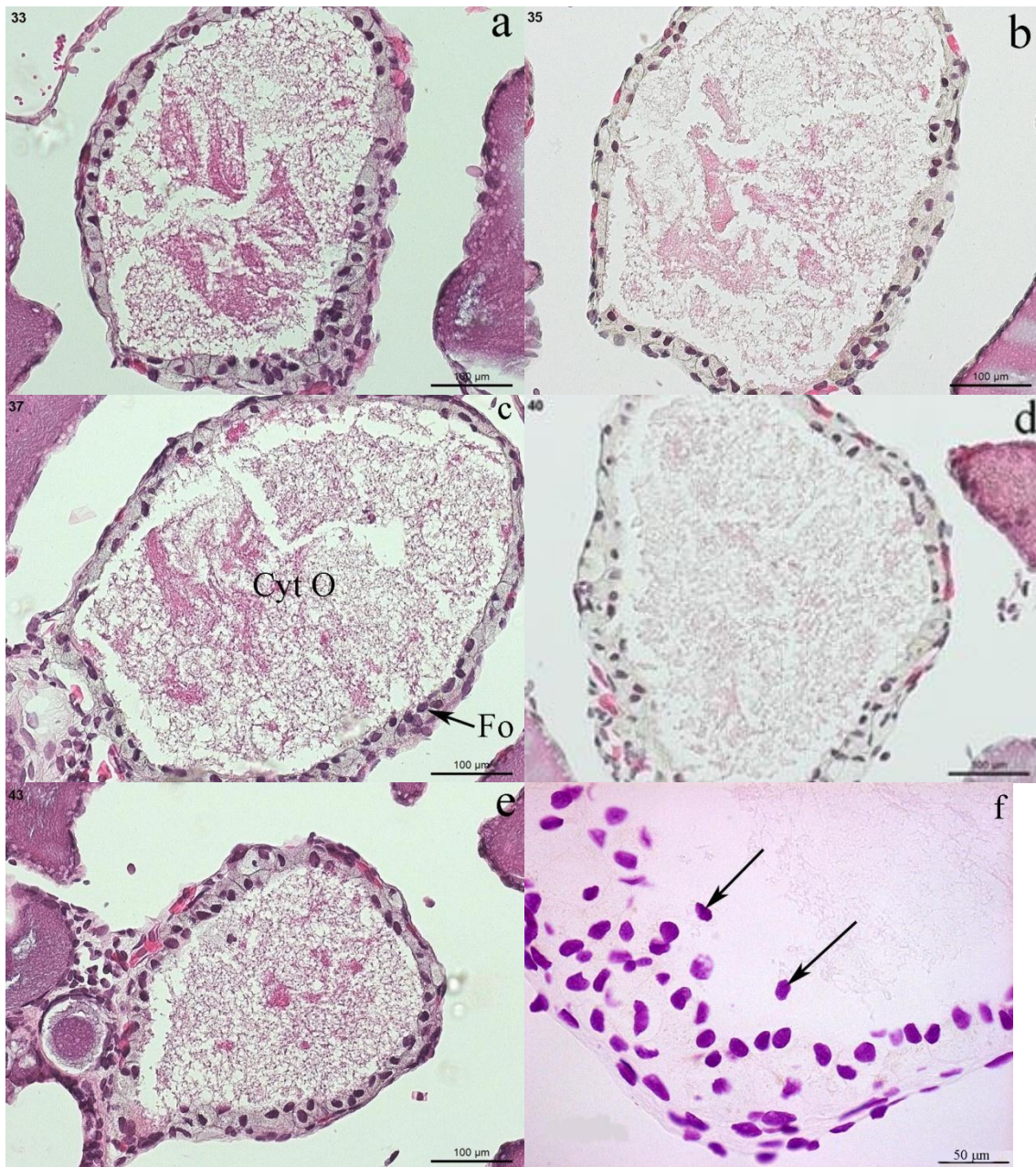
Atretični folikli zgodnje stopnje merijo od 500 do 800 µm, kar ustreza velikosti oocitov III.

Na tej stopnji degeneracije so celice folikularnega epitela pomnožene, citoplazma oocita je vidno spremenjena in fragmentirana (sl. 4a-e). Vitelinski ovoj je že razpadel, prav tako jedro z jedrci. Vezivna ovojnica ali teka je izraziteje ožiljena (sl. 4e).

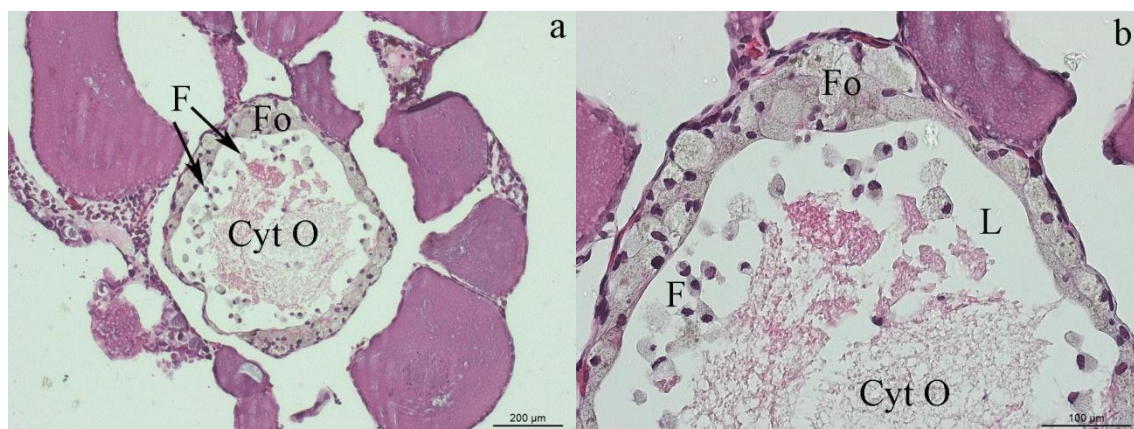
Pri nekaterih foliklih zgodnje stopnje so celice folikularnega epitela že povečane (sl. 5a-e, 6a, b). Posamezne spremenjene folikularne celice že invazirajo v citoplazmo oocita in prično s fagocitozo oocita (sl. 5f, 6a, b).



Slika 4a-e. Atretični folikel oocita III. Zgodnja (A) stopnja degeneracije. Celice folikularnega epitela (Fo) so pomožene, citoplazma oocita (Cyt O) pa spremenjena. Osebek P147. Izbrani posnetki zaporednih rezin istega folikla (zaporedna številka rezine je v zgornjem levem kotu vsake fotografije). Barvanje: sl. a, c, d, e – H&E; sl. b – Masson Fontana.



Slika 5a-f. Atretični folikel oocita III. Zgodnja (A) stopnja degeneracije. Izbrani posnetki zaporednih rezin istega folikla (zaporedna številka rezine je v zgornjem levem kotu vsake fotografije). Osebek P176. **c.** Celice folikularnega epitela (Fo) so povečane, citoplazma oocita (Cyt O) je fragmentirana. **e.** Vezivna teka je izraziteje ožiljena – eritrociti so rožnati. **f.** Posamezne spremenjene folikularne celice (puščice) vdrejo v notranjost citoplazme oocita. Barvanje: H&E, sl. f – Feulgen barvanje.



Slika 6a-b. Atretični folikel oocita III. Zgodnja (A) stopnja degeneracije. Osebek 176. Celice folikularnega epitela (Fo) so povečane. Izrazitejši je vdor fagocitnih celic (F) v notranjost folikla. Cyt O, preostanek citoplazme oocita; L, lumen folikla. H&E barvanje.

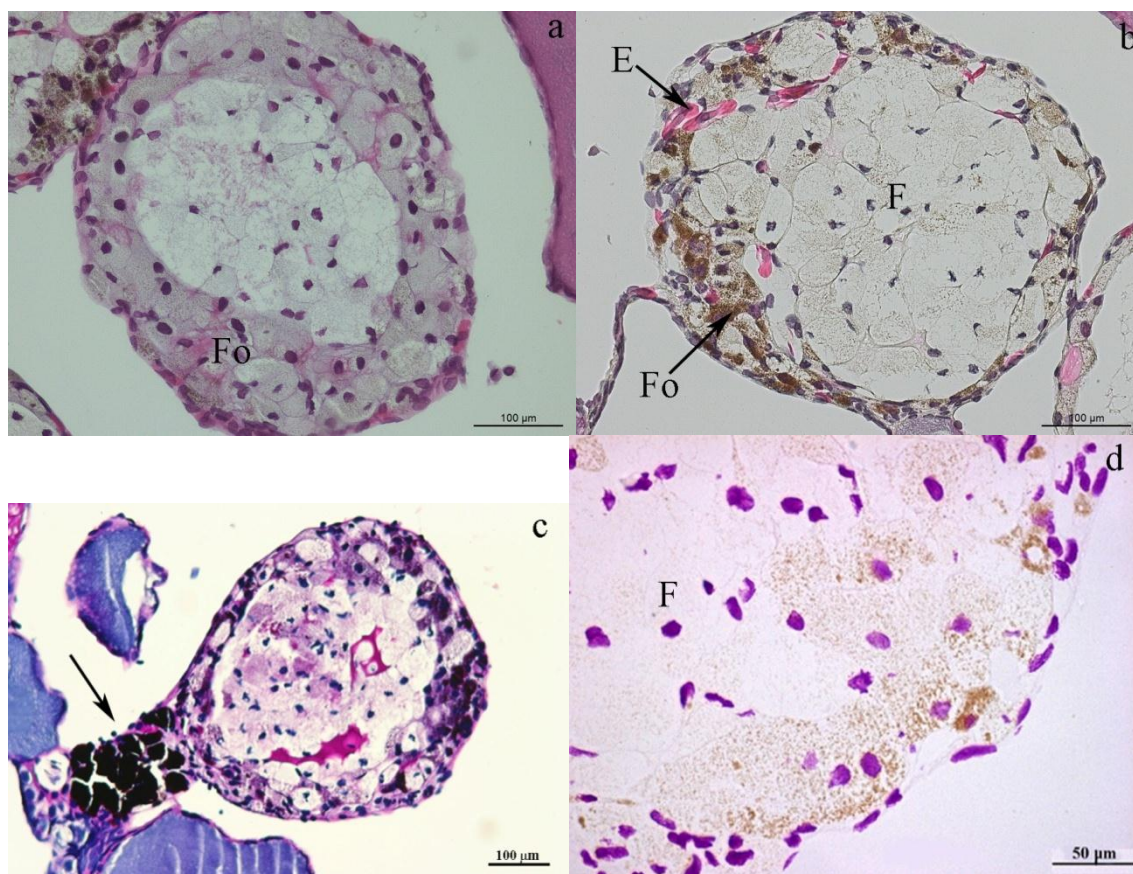
4.2.1.3 Vmesna (B) stopnja degeneracije AT-OIII

Atretični folikli oocitov III na vmesni stopnji degeneracije dosegaajo velikosti od 500 do 1000 μm .

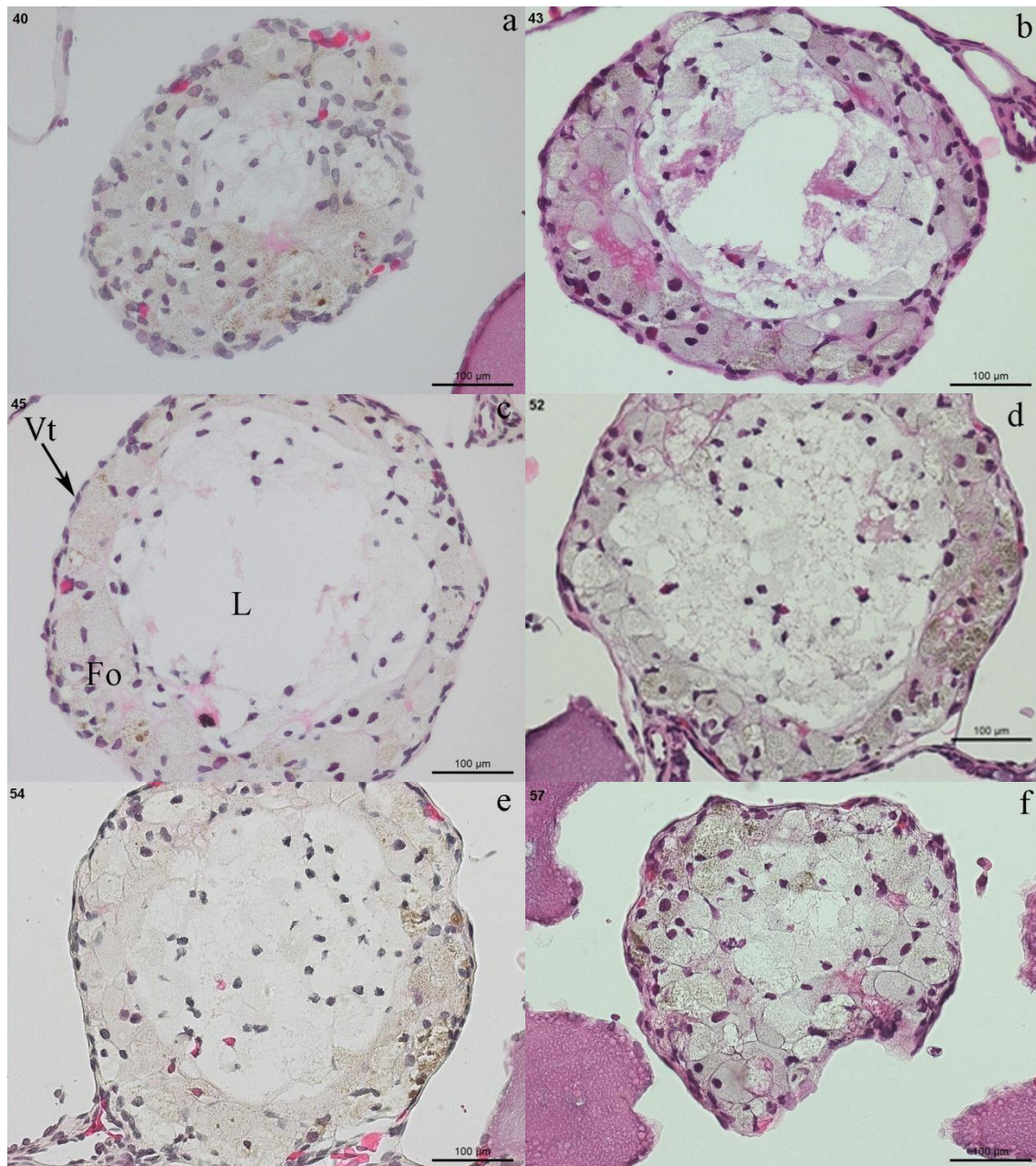
Pri foliklih vmesne stopnje degeneracije je notranjost folikla že zapolnjena s spremenjenimi in povečanimi fagocitnimi celicami (sl. 7a-c, 8a-f). Kljub temu da v foliklu še lahko zasledimo preostanek citoplazme oocita (sl. 8a, c), je le-ta večinoma že prebavljena. Kjer propadejo tudi fagociti, v foliklu nastane lumen. (sl. 8b, c).

Folikularne celice v robnem delu folikla so bodisi povečane in s homogeno citoplazmo (sl. 7a) ali pa manjše in temno pigmentirane (sl. 7b, c). Pecljati deli foliklov so lahko izrazito pigmentirani (sl. 7c). Izrazitejša je ožiljenje robnega dela folikla, zastopane pa so tudi posamezne žilice v notranjosti folikla (sl. 7b, 8a-f). Ožiljenost folikla je lahko tudi zelo intenzivna (sl. 9a-g).

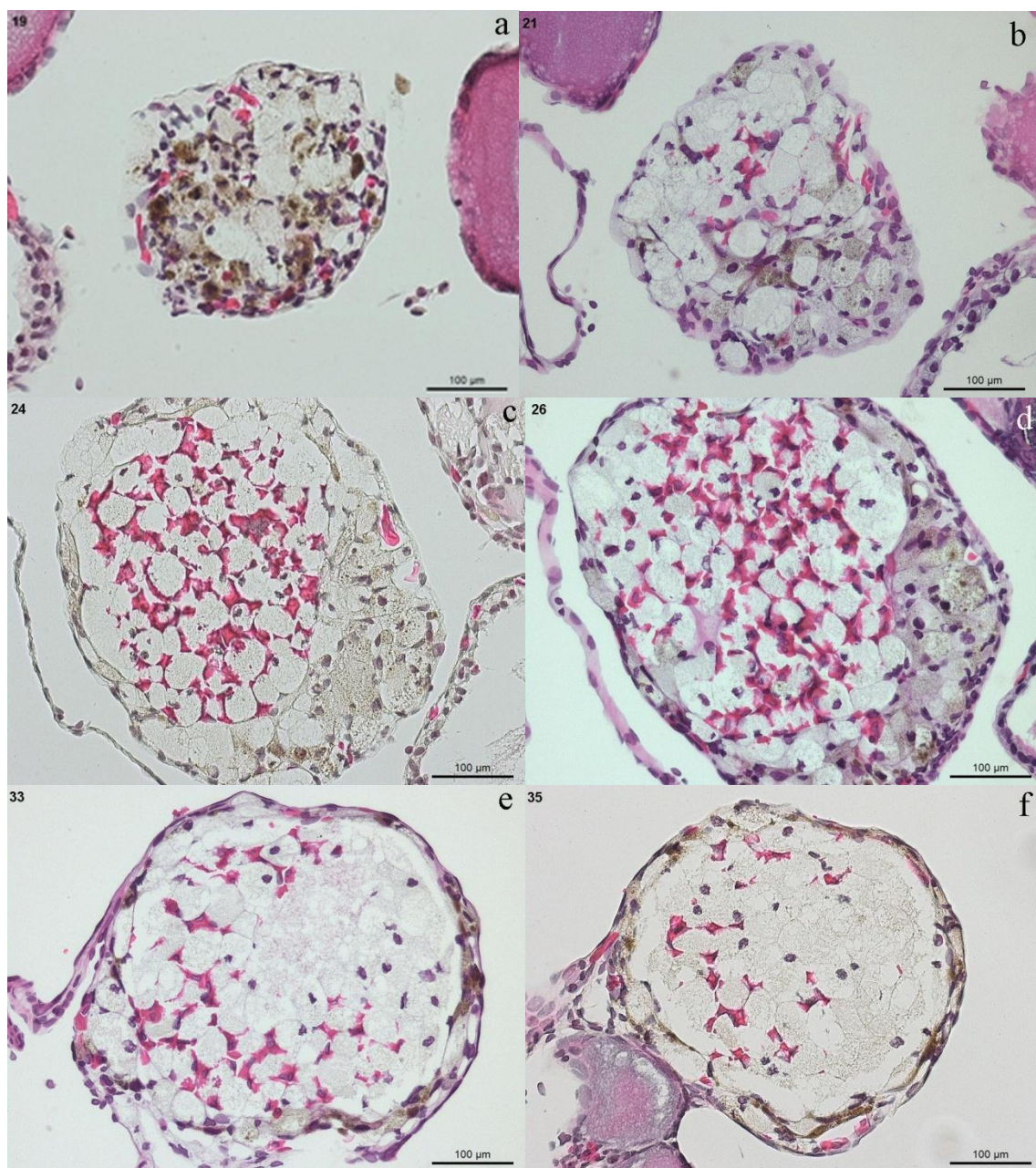
Povečane fagocitne celice v notranjosti folikla so svetlejša in z na videz prazno citoplazmo (sl. 7 a-c). Njihova jedra so majhna in heterokromatska (sl. 7d).



Slika 7a-d. Atretični folikel oocita III. Vmesna (B) stopnja degeneracije. Osebek P176. Folikel je zapolnjen s povečanimi fagocitnimi celicami (F). Folikularne celice (Fo) zunanega robnega dela folikla so povečane in tudi že pigmentirane. Pigmentiranost je izrazitejša v pecljatem delu folikla (sl. c, puščica). Jedra fagocitnih celic se s Feulgenom temneje obarvajo (sl. d). E, eritrociti. Barvanje: sl. a, b – H&E, sl. c – PAS reakcija, sl. d – Feulgen.



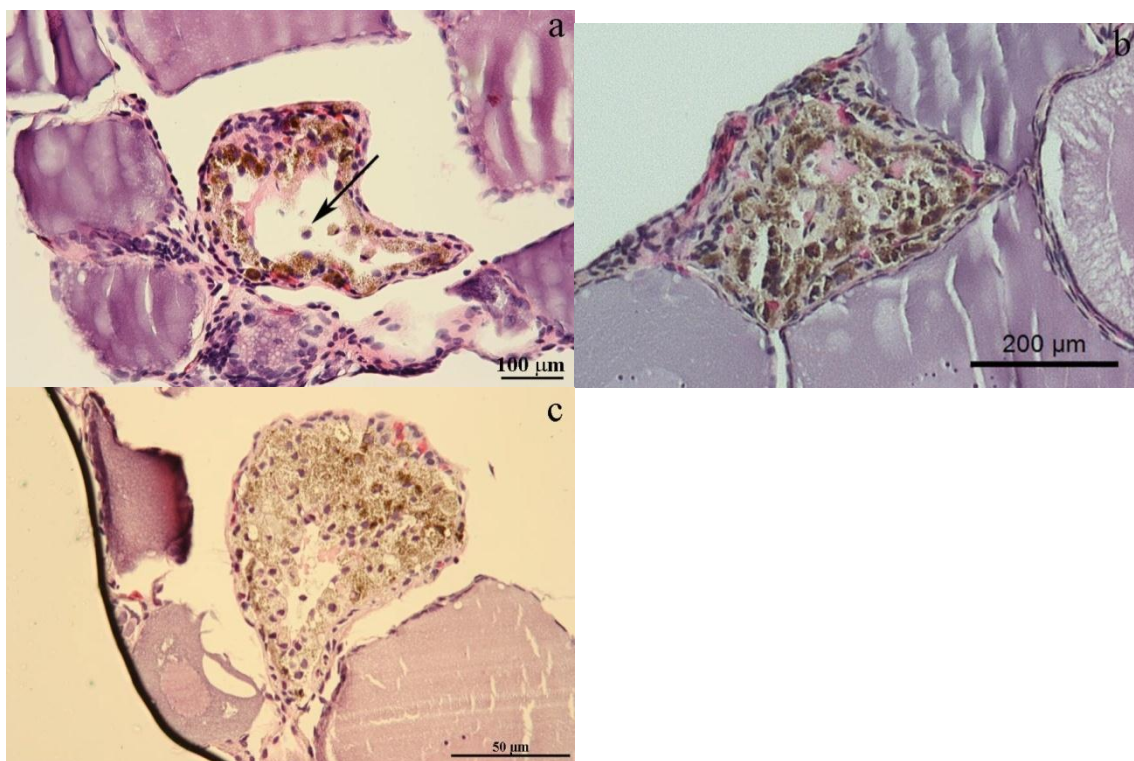
Slika 8a-f. Atretični folikel oocita III. Vmesna (B) stopnja degeneracije. Izbrani posnetki zaporednih rezin istega folikla (zaporedna številka rezine je v levem zgornjem kotu). Osebek P176. Folikel je zapolnjen s povečanimi fagocitnimi celicami (F). V centru folikla je lumen (L). Robne folikularne celice (Fo) so pigmentirane, celice v notranjosti folikla (F) so svetlejše. Izrazitejše je ožiljenje folikla. Rožnato obarvane celice na posnetkih so eritrociti v žilah. Vt, vezivni ovoj folikla. Barvanje: H&E.



Slika 9a-f. Atretični folikel oocita III. Vmesna (B) stopnja degeneracije. Izbrani posnetki zaporednih rezin istega folikla (zaporedna številka rezine je v levem zgornjem kotu). Osebek P176. Folikel je zapolnjen s fagocitnimi povečanimi celicami in bogato ožiljen. Robne folikularne celice so pigmentirane. Rožnato obarvane celice so eritrociti. Barvanje: H&E.

4.2.1.4 Pozna (C) stopnja degeneracije AT-OIII

Ti folikli so manjši, premera od 100 do 600 μm in izraziteje pigmentirani (sl. 10a-c). Le redke posamezne celice folikla so povečane. V notranjosti folikla so lahko manjši lumni z maloštevilnimi fagocitnimi celicami. Vezivna teka je izrazita in ožiljena.



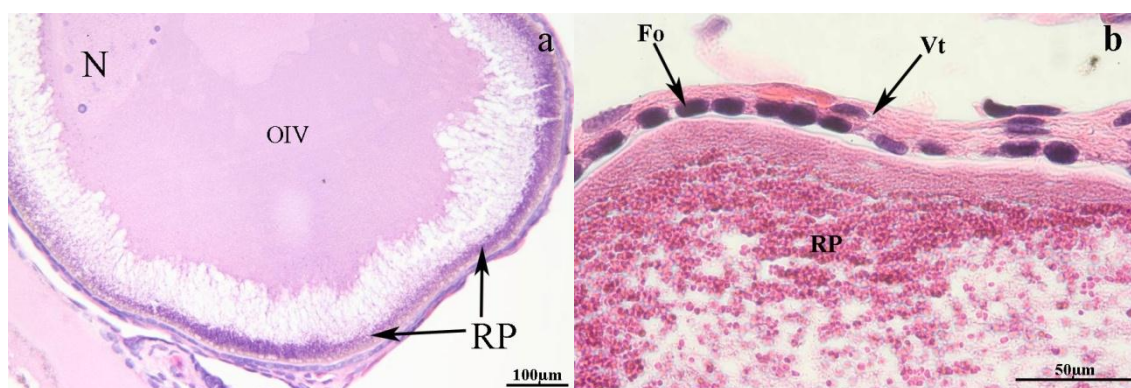
Slika 10a-c. Atretični folikli oocitov III. Pozna (C) stopnja degeneracije. Osebek P137. Folikli so manjši in pigmentirani. Fagocitne celice – puščica. Barvanje: H&E.

4.2.2 Atretični folikli oocitov IV (AT-OIV)

Atretične folikle oocitov IV smo opazili pri manjšem številu osebkov. V citoplazmi degenerirajočih oocitov, kot tudi v fagocitnih celicah folikla so rumenjakeve ploščice. Velikost teh atrezij je med 720 in 2600 μm . AT-OIV smo razdelili na zgodnjo, vmesno in napredno – pozno stopnjo degeneracije.

4.2.2.1 Normalen folikel oocita IV

V oocitih IV so rumenjakeve ploščice (sl. 11). Stena folikla je iz sloja sploščenih folikularnih celic, ki ga obdaja tanka vezivna ovojnica ali teka. Oocit obkroža vitelinska ovojnica. Citoplazma oocita je v centralnem delu homogena, v robnem delu pa vključuje rumenjakeve ploščice in maščobne kapljice, ki pri fiksaciji niso ohranjene. V jedru so jedrca in krtačasti kromosomi.



Slika 11a-b. Jajčni folikli. **a., b.** Normalen folikel z oocitom IV (OIV). Stena folikla je iz sloja sploščenih folikularnih celic (Fo), ki ga obdaja tanka vezivna ovojnica teka (Vt); N, jedro z jedrci; RP, rumenjakeve ploščice. Barvanje: H&E

4.2.2.2 Zgodnja stopnja degeneracije AT-OIV

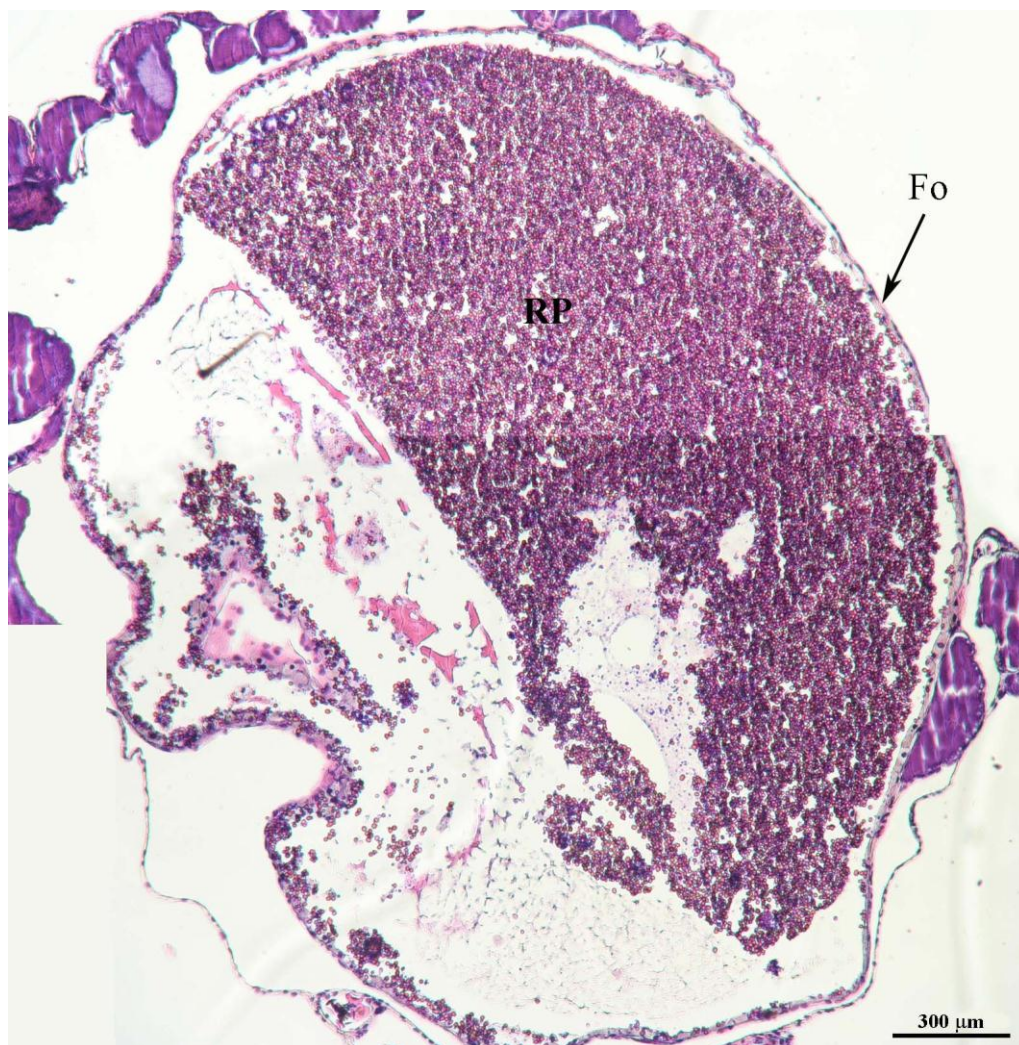
Folikli na zgodnji stopnji degeneracije, ki merijo do 2600 μm , so vključevali propadajoči oocit IV (sl. 12, 14). Citoplazma oocita je v enem delu še v celoti zapolnjena z rumenjakovimi ploščicami, del citoplazme oocita pa je že prebavljen. Celice folikularnega epitela so rahlo povečane in urejene v enem sloju (sl. 13e). Posamezne povečane folikularne celice so tudi že v citoplazmi oocita (sl. 13 c, d). V fagocitnih folikularnih celicah lako vidimo rumenjakeve ploščice. Vdor fagocitnih folikularnih celic v citoplazmo oocita je izrazitejši v pecljatem delu folikla (sl. 14). V tem delu je citoplazma oocita tudi že prebavljena.

4.2.2.3 Vmesna stopnja degeneracije AT-OIV

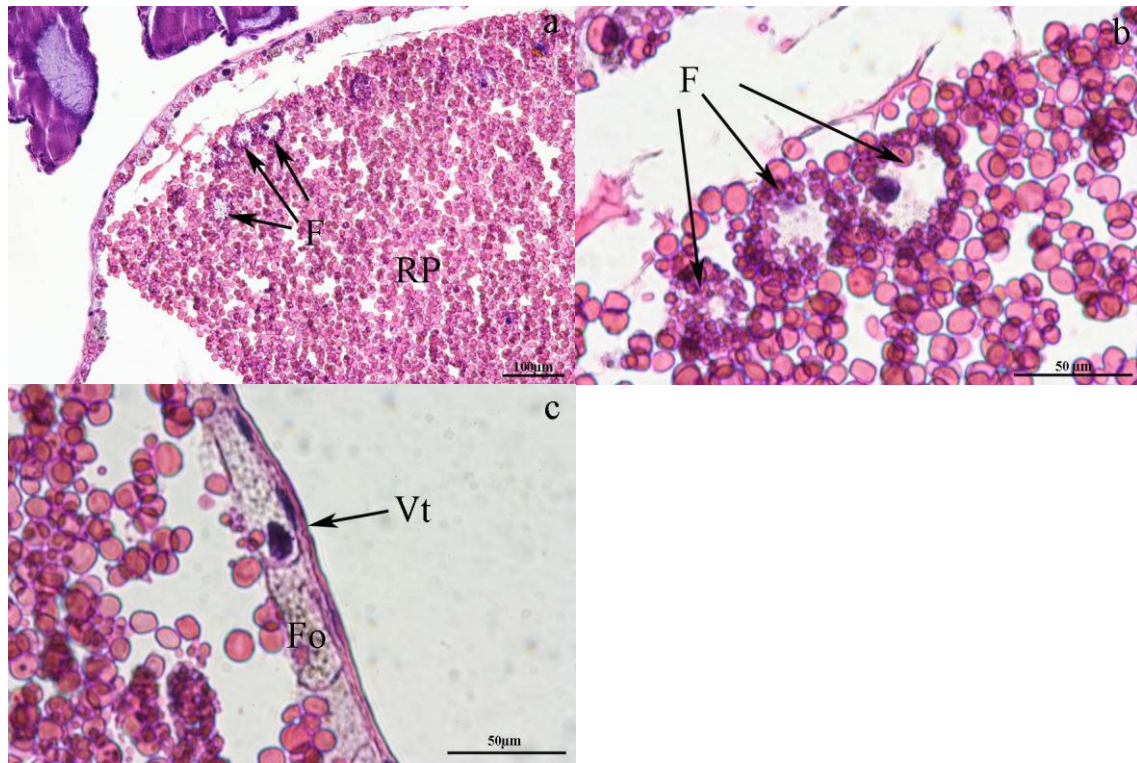
V foliklih na vmesni stopnji degeneracije, ki merijo do 2000 μm , je citoplazma oocita skoraj v celoti prebavljena (sl. 15a-f). V notranjosti folikla so razpršene fagocitne celice in manjši lumni. Jedra fagocitnih celic so majhna in izrazito heterokromatska (sl.15b). Folikularne celice so povečane in rahlo pigmentirane, vezivna teka je ožiljena (sl. 15b).

4.2.2.4 Napredna – pozna stopnja degeneracije AT-OIV

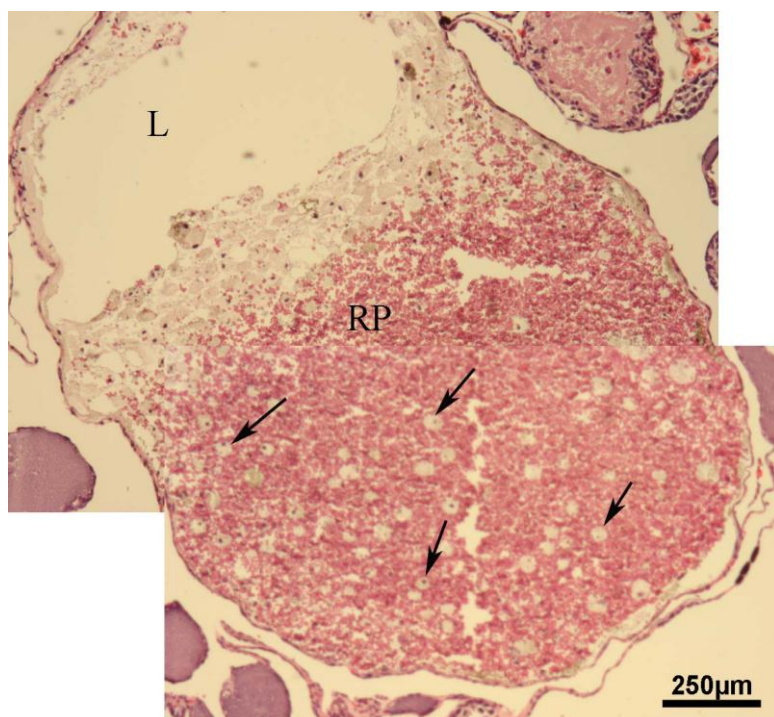
Folikle, ki jih skoraj v celoti zapolnjujejo celice vezivne ovojnice, ki merijo do 2000 μm , smo uvrstili v napredno pozno stopnjo degeneracije foliklov (sl. 16a). S trikromnim barvanjem po Massonu se vezivo barva modro (sl. 16c). V centru folikla so maloštevilni povečani fagociti, ki prebavljajo preostanek rumenjakovih ploščic (sl. 16b).



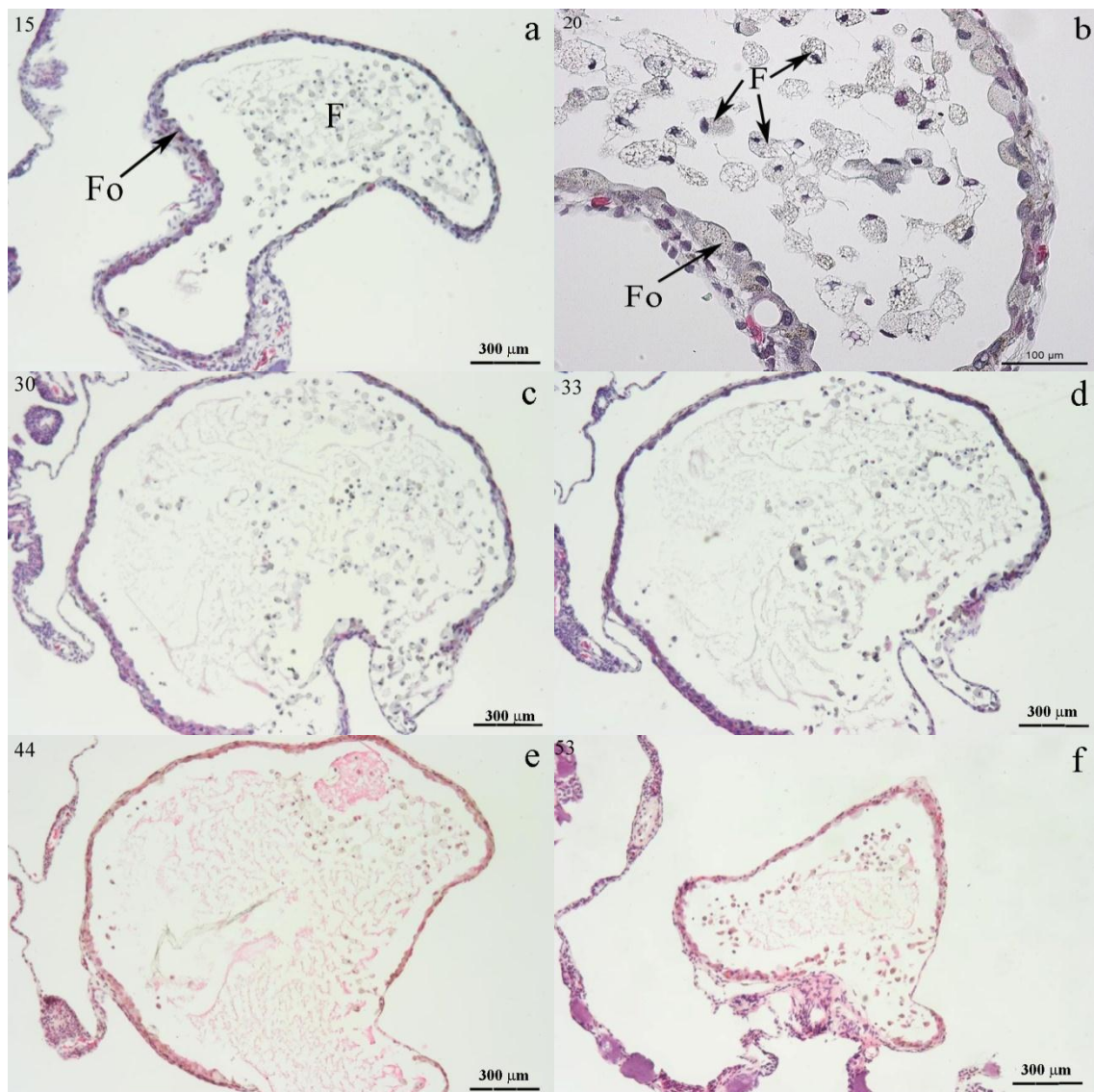
Slika 12. Atretični folikli oocitov IV. Zgodnja stopnja degeneracije folikla. Osebek P157. Del citoplazme oocita je prebavljen. Fo, folikularni ovoj; RP, rumenjake ploščice. Barvanje: H&E.



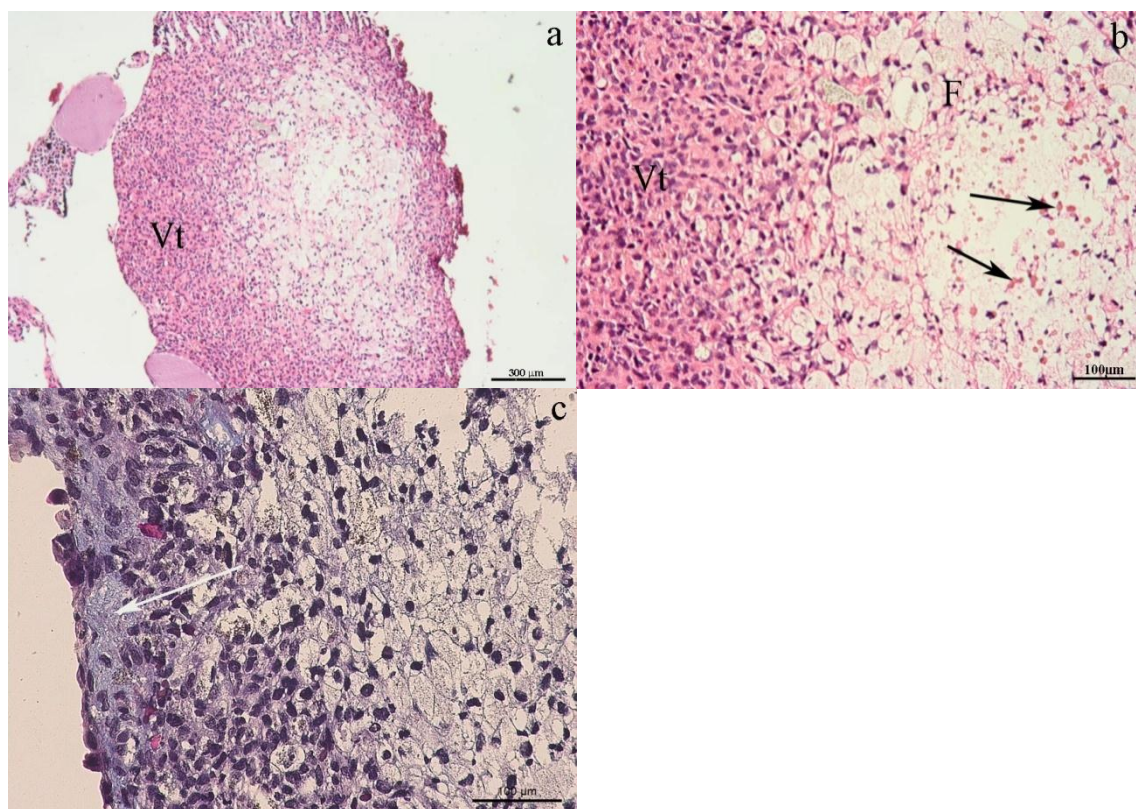
Slika 13a-c. Atretični folikli oocitov IV. Zgodnja stopnja degeneracije. Osebek P157. **a.** Robni del citoplazme oocita z rumenjakovimi ploščicami (RP) in fagociti (F). Fo, folikularni epitel. **b.** Fagociti (F) znotraj citoplazme oocita. V citoplazmi fagocitov so rumenjakeve ploščice. **c.** Enoslojni folikularni epitel (Fo) iz povečanih celic. Vezivna teka (Vt) je tanka, prekriva jo tanek epitel jajčnikovega lumna. Barvanje: H&E.



Slika 14. Atretični folikli oocitov IV. Zgodnja stopnja degeneracije. Osebek P169. V citoplazmi oocita so rumenjakeve ploščice (RP) in fagocitne celice (puščice). V pecljatem delu folikla so fagocitne celice številčnejše, nastaja tudi lumen (L). Barvanje: H&E.



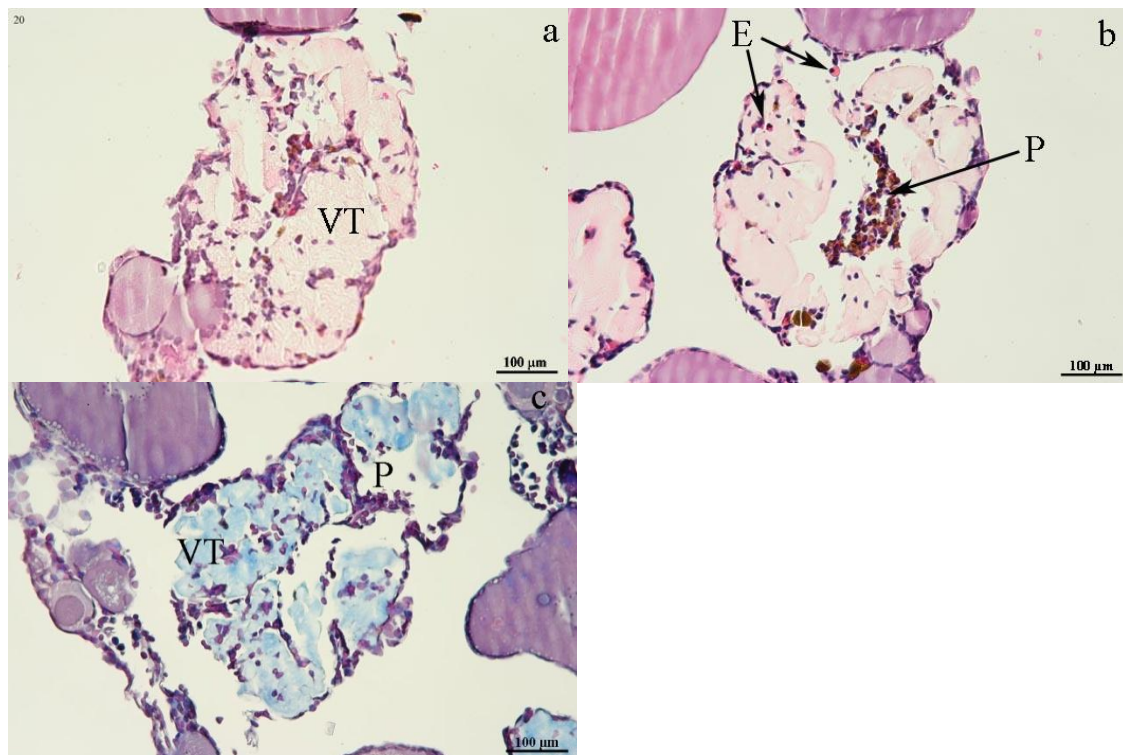
Slika 15a-f. Atretični folikli oocitov IV. Vmesna stopnja degeneracije. Osebek P182. Izbrani posnetki zaporednih rezin iste atrezije (zaporedna številka rezine je v levem zgornjem kotu). Citoplazma oocita je skoraj v celoti prebavljena. Fo, folikularni epitel; F, fagociti. Barvanje: H&E.



Slika 16a-c. Atretični folikli oocitov IV. Napredna-pozna stopnja degeneracije. Osebek P168. Stena folikla je iz številnih celic vezivne teke (Vt), v centru folikla so povečane fagocitne celice (F) in maloštevilne rumenjake ploščice (črne puščice). **c.** Vezivni del teke se obarva modro (bela puščica). Barvanje: sl. a,b – H&E, c – trikromno barvanje po Massonu.

4.2.3 Atretični folikli v fazi regresije (AT-R)

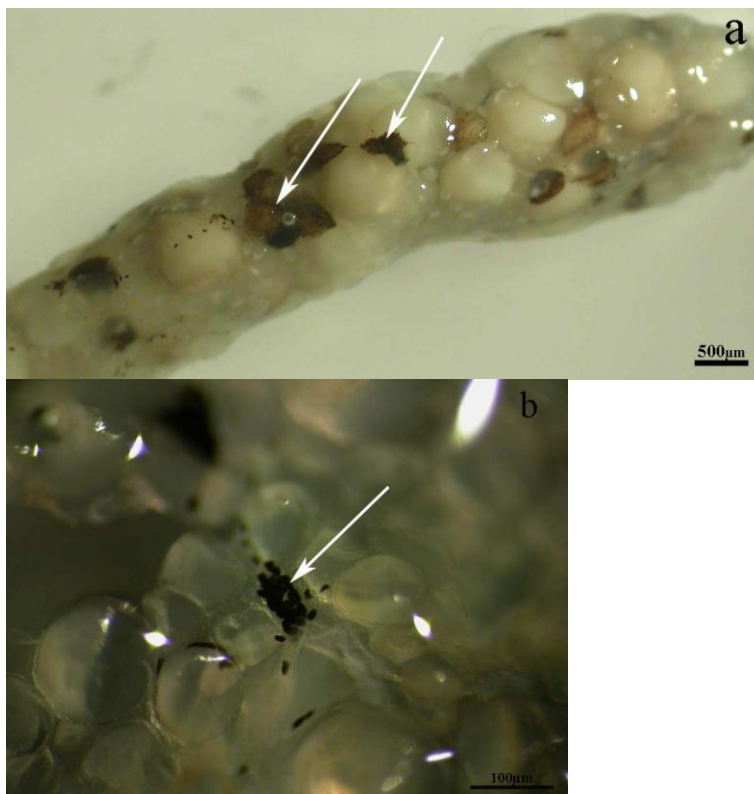
V jajčnikih treh osebkov (P151, P177, P182) smo našli atretične folikle zapolnjene s amorfnim homogenim materialom, ki se s selektivnim trikromnim barvanjem po Massonu za dokazovanje kolagena obarva intenzivno svetlo modro (sl. 17c). Predvidevamo, da gre za hialini material. Osrednji del folikla lahko vključuje lumen in celice s pigmentom. Zunanji robni del folikla in tudi notranjost folikla sta ožiljena. Predvidevamo, da gre za fazo regresije folikla.



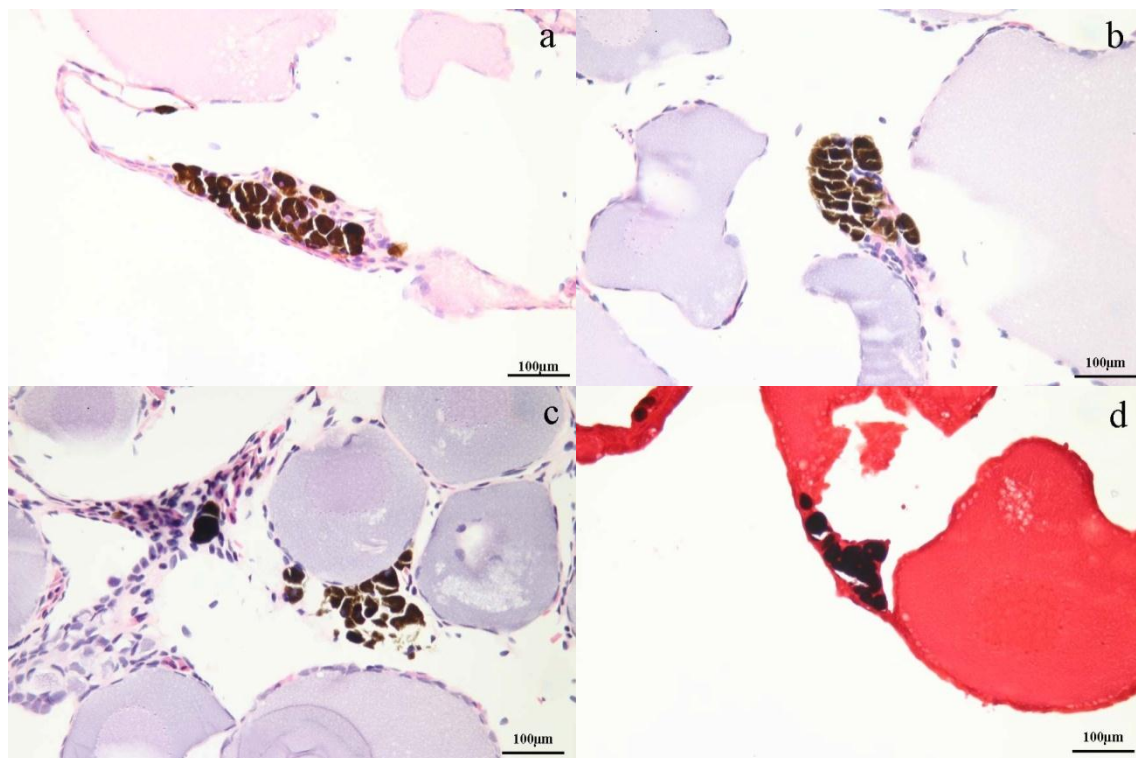
Slika 17a-c. Atretični folikli v fazi regresije. Osebek P177. E, eritrociti (rožnati), P, celice s pigmentom; VT, vezivno tkivo. Barvanje: sl. a, b – H&E, sl. c – trikromno barvanje po Massonu.

4.3 PIGMENTNI SKUPKI V VEZIVNI STENI JAJČNIKA

V jajčnikih so zastopani temni pigmentni skupki (sl. 18a, b). Gre za skupke celic v vezivni steni jajčnika, ki so rjavo do črno obarvane (sl. 19a-d). Z barvanjem po Masson-Fontana smo potrdili prisotnost melanina (sl. 19d).



Slika 18a-b. Jajčnik močerila s pigmentnimi skupki (puščica). Posnetka s stereolupo.



Slika 19a-d. Pigmentni skupki v vezivni steni jajčnika. **a-c.** Osebek P163. Barvanje: H&E. **d.** Masson-Fontana barvanje za melanin. Osebek P176.

4.4 ZASTOPANOST ATREZIJ V JAJČNIKU MOČERILA

V preglednici 3 podajamo naslednje podatke: zrelost jajčnika, ki je izražena z najstarejšo zoritveno fazo oocitov (povzeto po Žibert, 2010), zastopanost AT pri posameznih osebkih, največje število AT na en prerez jajčnika in tip atretičnega folikla glede na degenerirajoči oocit. Pregledali smo zaporedne histološke rezine jajčnikov dvajsetih osebkov in pri trinajstih našli atretične folikle (Preglednica 3).

Na histoloških rezinah vsakega petega zaporednega objektnega stekla vseh osebkov, ki so atrezije imeli, smo atrezije tudi prešteli. Za štetje AT na prerezih jajčnikov smo se odločili zato, da lahko podamo grobo oceno razlik v frekventnosti AT med načrtno stradanimi osebki in ostalimi osebki v vzorcu, saj so bile razlike pri pregledu histoloških preparatov zelo očitne. Iz podatkov je razvidno, da so imeli največ atrezij stradani osebki (Preglednica 3). Medtem ko smo pri večini osebkov našli eno do največ dve AT sočasno na eni histološki rezini, so imeli stradani osebki od sedem do največ sedemnajst AT sočasno na eni histološki rezini. Med stradanimi osebki AT ni imel le en osebek (P132), ki je bil stradan najkrajši čas (1 mesec) (Preglednica 3).

Pri osmih osebkih smo v jajčnikih našli atretične folikle oocitov III (AT-OIII), od tega je imela polovica osebkov oocite III kot najstarejšo zrelostno fazo oocitov, druga polovica pa oocite IV (Preglednica 3). Atretične folikle oocitov IV (AT-OIV) smo našli pri štirih osebkih (Preglednica 3). Dva osebka sta imela kot najstarejšo zoritveno fazo oocite III in dva oocite IV. Kot je razvidno iz Preglednice 3, ni nujno da gredo v proces atrezije oociti, ki so najstarejša zoritvena faza oocitov v jajčnikih.

Pri treh osebkih smo zasledili AT, ki jih nismo mogli vključiti v nobeno od zgoraj omenjenih oblik AT, izkazovali pa so značilnosti foliklov v fazi regresije (AT-R) (Preglednica 3). Dva osebka sta imela oocite II in eden oocite III kot najstarejšo zrelostno fazo oocitov.

Z izjemo dveh osebkov so bili v jajčnikih zastopani propadajoči oociti iste zrelostne faze, torej so bile prisotne atrezije bodisi AT-OIII ali pa AT-OIV (Preglednica 3). Pri osebkju P169 smo sočasno našli AT-OIII in AT-OIV ter pri osebkju P182 AT-OIV in AT-R (Preglednica 3).

Preglednica 3: Atrezije v jajčniku močerila (*Proteus anguinus anguinus*).

Evidenčna št. osebka	Prisotnost AT	Število AT/histol. rezino ^a	Zrelost jajčnika ^b	Morfološke oblike AT ^c
P151	da	1	OII	AT-R
P177* ¹	da	2	OII	AT-R
P152	da	1	OIII	AT-OIII
P169	da	2	OIII	AT-OIII in AT-OIV
P171* ³	da	7	OIII	AT-OIII
P176* ³	da	17	OIII	AT-OIII
P182	da	2	OIII	AT-OIV in AT-R
P137* ²	da	13	OIV	AT-OIII
P147* ³	da	8	OIV	AT-OIII
P150	da	1	OIV	AT-OIII
P157	da	1	OIV	AT-OIV
P165	da	1	OIV	AT-OIII
P168	da	1	OIV	AT-OIV
P131	ne		OIV	
P132* ¹	ne		OIV	
P145	ne		OIV	
P162	ne		OIII	
P163	ne		OIII	
P181	ne		OII	
P189	ne		OIII	

* stradani osebki

¹ : osebek stradan 1 mesec² : osebka stradana 4 mesece³ : osebki stradani 14 – 18 mesecev^a : Število atretičnih foliklov na histološko rezino pri enem osebku pomeni največje zabeleženo število atretičnih foliklov na eni histološki rezini izmed vseh 120 pregledanih histoloških rezin osebka.^b : Zrelost jajčnika je bila določena z najbolj zrelo zoritveno fazo oocitov. OII – OIV: zoritvene faze oocitov.^c : AT-OIII – atretični folikli oocitov III; AT-OIV – atretični folikli oocitov IV; AT-R – atretični folikli v fazi regresije.

5 DISKUSIJA

V okviru diplomskega dela smo pregledali vzorce jajčnikov dvajsetih osebkov bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Jajčniki trinajstih osebkov so vključevali atrezije. Atrezije v jajčnikih močerila so imele zelo različen morfološki izgled. Nekateri folikli so vključevali propadajoč oocit, v drugih je bil oocit že prebavljen in folikel zapolnjen s spremenjenimi celicami folikularnega epitela ali fagocitnimi celicami. Folikli so bili tudi različno veliki, različno pigmentirani in eni bolj ožiljeni kot drugi. Jajčniki so lahko vključevali zelo različne stopnje degeneracij foliklov. Pri jajčnikih, ki so imeli sočasno prisotne različne stopnje degeneracije foliklov, smo morfološke značilnosti veliko lažje interpretirali in so bili hkrati tudi izhodišče za razumevanje in uskladitev posameznih stopenj degeneracij v tistih jajčnikih, ki so imeli samo eno od stopenj. Pri razvrstitvi raznolikih foliklov na različne stopnje procesa degeneracije jajčnih foliklov smo se opirali na delo Ogielske in sodelavcev (2010), ki natančneje opisuje morfologijo atrezij v jajčnikih brezrepcev.

5.1 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI ATRETIČNIH FOLIKLOV

Anatomsko se degenerirani oociti pri močerilu od normalnih razlikujejo po barvi, lahko tudi po obliki in velikosti. AT so marmoriranega izgleda, včasih nepravilnih oblik in različnih velikosti, saj je ta odvisna od zoritvene faze oocita, ki vstopi v degeneracijo, in stopnje procesa degeneracije.

Atrezije v jajčniku močerila ustrezajo tipu I, ki ga opisujejo Ogielska in sodelavci (2010). Za ta tip degeneracije je značilno, da folikularne celice proliferirajo, hipertrofirajo in postanejo fagocitno ter prebavijo vitelogeni oocit. Tudi pri ribah poteka proces degeneracije foliklov na podoben način (Hunter in Macewicz, 1985). Ogielska in sodelavci (2010) navajajo še dva tipa atrezij (tip II in III) v jajčnikih brezrepcev, ki jih pri močerilu nismo zasledili. V nobenem primeru nismo videli razpada folikla in razpršitve citoplazme oocita, kot je značilno za atrezije tipa II, niti nismo opazili atrezij tipa III, pri katerih folikularne celice ne vdrejo v citoplazmo oocita.

Pri oviparnih vretenčarjih so degeneraciji izpostavljeni predvsem vitelogeni oociti (Guraya, 1989; Ogielska in Bartmanska, 2009). Tudi v jajčniku močerila so atretični folikli vključevali propadajoče vitelogene oocite (OIII, OIV). Zaradi večje preglednosti opisa rezultatov, smo atrezije razdelili na dve morfološki obliki: atretične folikle oocitov III (AT-OIII) in atretične folikle oocitov IV (AT-OIV). Ti dve morfološki obliki smo potem še naprej razdelili na različne stopnje procesa degeneracije, ki smo jih poimenovali kot zgodnjo (A), vmesno (B) in pozno (C) stopnjo degeneracije. Stopnje procesa degeneracije ustrezajo stopnjam od A do C opisanim za dvoživke (Ogielska in sod., 2010). Pri AT-OIV smo opisali še napredno-pozno fazo, ki je v primeru AT-OIII nismo zasledili, prav tako je ne opisujejo Ogielska in sodelavci (2010). Poleg AT-OIII in AT-OIV smo v jajčnikih manjšega števila osebkov zasledili še eno morfološko obliko AT, ti so vključevali amorfni hialini material. Uvrstili smo jih v fazo regresije atretičnega folikla (AT-R).

V jajčniku močerila smo zasledili AT iste zoritvene faze oocitov, bodisi samo AT-OIII ali pa AT-OIV. Pri dveh osebkih so bili v jajčniku sočasno zastopani AT različnih zrelostnih

faz oocitov, pri enem osebku AT-OIII in AT-OIV ter pri drugem AT-OIV in AT-R, kar nakazuje na možnost sočasne degeneracije različnih zrelostnih faz oocitov.

5.1.1 Atretični folikli oocitov III (AT-OIII)

Atretični folikli AT-OIII so vključevali že delno degenerirane oocite, tako da značilnih začetnih sprememb, ki se dogodijo v oocitih, nismo zasledili. Pri dvoživkah in ribah avtorji kot začetek degeneracije navajajo skrčenje jedra in zlitje jedrc v večje agregate ter razpad vitelinske membrane (Hunter in Macewicz, 1985; Miranda in sod., 1999; Ogielska in sod., 2010). V naših primerih je bila citoplazma oocitov že vidno spremenjena, jedro z jedrci in vitelinski ovoj pa razgrajeni. Spremljali smo lahko le nadaljnje spremembe folikularnega ovoja in fagocitozo citoplazme oocita.

Za zgodnjo (A) stopnjo AT-OIII je značilno, da je citoplazma oocita vidno spremenjena, celice folikularnega epitela se pomnožijo in povečajo, vdrejo v citoplazmo oocita ter prično s fagocitozo in prebavo citoplazme oocita.

Na vmesni (B) stopnji degeneracije so folikli že zapolnjeni s povečanimi spremenjenimi celicami folikularnega epitela, ki fagocitirajo citoplazmo oocita. Robne celice folikla (folikularne celice in/ali celice vezivne teke) akumulirajo pigment, ožiljenost folikla pa je izrazitejša. Mestoma se v foliklu, kjer so tudi fagociti sami degenerirali, pojavijo prazni prostori ali lumni.

V pozni fazi degeneracije (C) se pigmentiranost stopnjuje, velikost folikla pa zmanjšuje.

Vse tri stopnje degeneracije AT-OIII se ujemajo z opisanimi stopnjami (A do C) za brezrepce (Ogielska in sod., 2010). Pri močerilu nismo zasledili izrazite stopnje D, torej kondenzacije črnega pigmenta v zelo zmanjšanem foliklu z nagubano, zadebeljeno in močno ožiljeno vezivno steno.

5.1.2 Atretični folikli oocitov IV (AT-OIV)

Morfologija AT-OIV se po nekaterih značilnostih razlikuje od morfologije AT-OIII, vendar še vedno govorimo o atrezijah tipa I po Ogielski in sodelavcih (2010). Poleg razlik v velikosti folikla in prisotnosti rumenjakovih ploščic v citoplazmi oocita, je folikularni epitel v zgodnjem stadiju degeneracije tanjši in celice epitela niso izrazito pomnožene. Folikularne celice so sicer povečane, vendar še vedno urejene v enem sloju. Vdor fagocitnih folikularnih celic v citoplazmo oocita je izrazitejši v pecljatem delu folikla, prav tako je v tem delu citoplazma oocita hitreje fagocitirana. Predvidevamo, da se degeneracija sprva prične v enem delu folikla in se postopoma širi v preostali del. Tega pri AT-OIII nismo zasledili, prav tako Ogielska in sodelavci (2010) tega ne opisujejo. Tudi pigmentiranost foliklov AT-OIV ni tako izrazita kot pri AT-OIII. Pri AT-OIV smo zasledili folikle z obsežno vezivno teko in številnimi vezivnimi celicami, ki zapolnjujejo skoraj celoten folikel. V centru folikla so le še posamezni povečani fagociti, ki prebavljajo ostanek rumenjakovih ploščic. Tak folikel smo uvrstili v napredno-pozno stopnjo degeneracije, saj po morfologiji odstopa od pozne stopnje degeneracije foliklov AT-OIII,

prav tako nismo našli podobnosti z nobeno od opisanih faz po Ogielski in sodelavcih (2010). Kakšna je nadaljnja usoda takega folikla nam ni poznano.

5.1.3 Atretični folikli v fazi regresije (AT-R)

V jajčniku treh osebkov smo našli atretične folikle z amorfnim materialom. Predvidevamo, da so ti folikli v fazi regresije (AT-R), saj je morfološki izgled teh foliklov podoben fazi regresije ali brazgotinjenja AT v jajčnikih sesalcev, za katero je značilen hialini material (Ross in sod., 1989), ki se s histološkim barvanjem tudi značilno obarva (Presnell in sod., 1997). Sčasoma tak folikel v jajčniku sesalcev izgine, saj vezivna stroma jajčnika zapolni degenerirajoči folikel. Predvidevamo, da je amorfni material v foliklih močerila hialine narave, saj se z eozinom barva značilno rožnato in s trikromnim barvilom modro. Atretične folikle v fazi regresije (AT-R) smo našli pri dveh osebkih, katerih jajčniki so vključevali le mlajše zrelostne faze oocitov (OII), in pri enem osebku z oociti III. Slednji osebek je imel poleg AT-R tudi AT-OIII.

Ni nam poznano katere zrelostne faze oocitov ostajajo v jajčniku močerila po ovulaciji zrelih jajčnih celic, kot tudi ne kaj se zgodi s praznimi folikli po ovulaciji in kaj z neovuliranimi folikli. Jajčniki dveh osebkov močerila z mlajšimi oociti in AT-R, bi lahko izražali situacijo po ovulaciji zrelih jajčnih celic, kar bi tudi pomenilo, da jajčnik močerila ni asinhroni tip jajčnika, kot opisuje Bizjak Mali (2010, 2011). Asinhroni tip jajčnika vključuje sočasno različne zrelostne faze oocitov, vključno z zrelemi, ki nato ovulirajo. Pričakovali bi, da v jajčniku po ovulaciji ostajajo tudi mlajše faze vitelogenih oocitov. Situacija v jajčniku osebka, ki ima oocite III ter sočasno vključuje AT-OIV in tudi AT-R zgoraj omenjeno predvidevanje v neki meri tudi potrjuje. Sočasna prisotnost AT-R in AT-OIV v jajčniku bi lahko izkazovala regresijo praznih foliklov po ovulaciji in propad neovuliranih foliklov.

Jajčniki osebkov iz vzorca so vključevali atrezije na različnih stopnjah degeneracije, tako da je izmerjena velikost AT zelo raznolika, od 250 do 1250 μm . Nastanek AT je kontinuiran proces, zato velikost folikla ni konstantna, ta se tekom procesa degeneracije postopoma zmanjšuje. Vedno smo merili največji premer na zaporednih histoloških rezinah posameznega AT. Izrazit razpon velikosti atrezij je pri dveh osebkih: pri enem od 100 do 800 μm in drugem od 175 do 1250 μm , saj so jajčniki omenjenih osebkov vključevali najbolj raznolike stadije AT. Največji premer (od 725 do 2600 μm) so imeli AT-OIV.

5.2 PIGMENTIRANOST ATRETIČNEGA FOLIKLA IN PIGMENTNI SKUPKI V STENI JAJČNIKA

Pigmentiranost AT v jajčnikih močerila se z napredovanjem procesa degeneracije stopnjuje, prav tako se folikli zmanjšujejo vsled postopnega zmanjševanja števila celic folikla. Prvo kopičenje pigmenta v spremenjenih folikularnih celicah smo zasledili na vmesni stopnji degeneracije (B), ko je citoplazma oocita že prebavljena in prve fagocitne celice začnejo z lastnim propadom. To ustreza opisani pigmentiranosti foliklov pri ribah in dvoživkah (Hunter in Macewicz, 1985; Guraya, 1989; Linares-Casenave in sod., 2002; Uribe Aranzabal, 2003; Ogielska in sod., 2010). Isti avtorji opisujejo tudi postopno

zmanjševanje atretičnih foliklov. Pri ribah atretični folikli v končni fazi degeneracije dosegajo 20% začetne velikosti foliklov (Miranda in sod., 1999). Kopičenje pigmenta v AT razlagajo s fagocitozo oocitov in degeneracijo fagocitnih celic (Linares-Casenave in sod., 2002). Guraya (1976 cit. po Uribe Aranzabal, 2003) za dvoživke navaja, da je rumenjaki v AT v procesu resorpcije, kjer se maščoba in proteini sprva zlivajo v večjo maso trigliceridov, ta se postopno razgradi in prebavi s pomočjo folikularnih celic, v celicah pa ostajajo agregacije pigmentnih granul. V AT pri ribah različni avtorji navajajo zastopanost melanina (Linares-Casenave in sod., 2002) kot tudi lipofuscina (Miranda in sod., 1999). Tudi mi smo želeli ugotoviti kateri od pigmentov se kopiči v AT pri močerilu, vendar nam histološki barvanji Masson-Fontana za dokazovanje melanina in indofenolna metoda za dokazovanje lipofuscina, nista dali dokončnega odgovora. Barvanje Masson-Fontana je bilo pozitivno, vendar ne razlikuje med obema pigmentoma, barvanje z indofenolno metodo pa žal ni uspelo.

V vezivni steni jajčnika močerila so zastopani temni pigmentni skupki celic, ki so lahko rezidualni preostanek atrezij. Kondenzirane skupke črnega pigmenta ob zaključku atrezij (D stopnja) v jajčnikih brezrepcev navajajo Ogielska in sodelavci (2010). Pri repatih dvoživkah je končna faza AT iz folikularnih celic napolnjenih s fagocitiranim pigmentom, ki jih obkroža vezivna teka (Uribe Aranzabal, 2003). Linares-Casenave in sodelavci (2002) pri jesetru opisujejo, da usode melanina v foliklih po končni fazi AT ter njegovega pomena ne poznajo in povzemajo raziskave na kečigah (Faleeva, 1965 cit. po Linares-Casenave in sod., 2002), kjer se atretična telesa preoblikujejo v večcelične strukture z melaninskim pigmentom, ki ostanejo v jajčniku vsaj do naslednjega drstenja. Pigmentni skupki v steni jajčnika močerila so lahko del ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema, ki je zastopan v večini mehkih tkiv poikilotermnih vretenčarjev (Prelovšek, 2002). So pravzaprav neke vrste melanomakrofagi. V jajčniku močerila bi lahko vršili fagocitozo in akumulacijo nastalih produktov v procesu degeneracije foliklov.

5.3 APOPTOZA V ATRETIČNIH FOLIKLIH

Palumbo in Yeh (1994) sta z raziskavami na podganjih jajčnikih dokazala, da je osnovni mehanizem pri degeneraciji foliklov apoptoza ali celična smrt tipa I. Apoptoza je v folikularnih celicah ovarija sesalcev začetni dogodek atrezij, medtem ko je pri ribah apoptoza folikularnih celic zastopana šele v poznih stopnjah AT, ko je rumenjaki že prebavljen (Wood in van Der Kraak, 2001, Santos in sod., 2008). Folikularne celice so namreč ključne pri proteolizi in resorpciji rumenjaka oocita, tako preden nastopi apoptoza intenzivno potekata heterofagija in avtofagija (Santos in sod., 2008). Z barvanjem po Feulgenju smo želeli preveriti, ali so jedra folikularnih celic AT sprememljena, kot tudi ali so zastopana apoptotična telesa. Izrazitih sprememb v jedrih folikularnih celic zgodnjih in vmesnih stopenj AT nismo zasledili. Pri poznih stopnjah AT z barvanjem po Feulgenju žal nismo bili uspešni, saj smo že v osnovi izbrali napačna objektna stekla, ki niso vključevala željenih stopenj degeneracije.

5.4 VPLIV STRADANJA NA ZASTOPANOST ATRETIČNIH FOLIKLOV V JAJČNIKU

Pri ribah in dvoživkah je nastanek atretičnih foliklov v jajčniku normalen pojav, ki regulira število oocitov (Santos in sod., 2008; Ogielska in sod., 2010). Atrezije so frekventnejše ob izpostavitvi osebkom različnim stresnim dejavnikom, med drugim tudi stradanju (Matova in Cooley, 2001; Santos in sod., 2008; Ogielska in sod., 2010). Pri dvoživkah so atrezije po obdobju stradanja številčnejše, občutljivejši pa so predvsem vitelogeni oociti (Dumont, 1972; Ogielska in sod., 2010). Vpliv stradanja na zoritve oocitov se izraža tudi v jajčnikih močerila, saj smo pri stradanih osebkih, ki so bili stradani daljše časovno obdobje zasledili večje število AT kot pri ostalih. Pri osebkih stradanih od 14 do 18 mesecev smo našli največje število atrezij, in sicer do sedemnajst na eni histološki rezini. Veliko AT je imel tudi osebek stradan 4 mesece (do trinajst AT na histološki rezini). Dva osebka sta bila stradana krajši čas (1 mesec). Pri enem AT nismo našli, vendar je imel v jajčniku oocite IV in bi AT zato lahko pričakovali, drugi pa je imel v jajčniku oocite II in atretične folikle v fazi regresije (AT-R). To si lahko razlagamo s hipotezo, da so folikli AT-R pri osebku z oociti II preostanek postovulatornih foliklov, ovulacija pa se je zgodila preden smo osebek izlovili.

6 SKLEPI

- V večini jajčnikov močerila (*Proteus anguinus anguinus*) so zastopane atrezije, ki so številčnejše v jajčnikih stradanih osebkov.
- Oociti, ki degenerirajo, so bodisi III. ali pa IV. zrelostne faze. Oocit, ki vstopi v proces degeneracije ni nujno tudi najstarejša zastopana zrelostna faza oocitov, ki jih jajčnik vključuje.
- V istem jajčniku so lahko sočasno atrezije obeh omenjenih zoritvenih faz oocitov (OIII in OIV). Prav tako so sočasno zastopane različne stopnje degeneracije folikla.
- Degeneracija foliklov poteka v treh stopnjah (zgodnja, vmesna in pozna).
- Na zgodnji stopnji degeneracije folikla je še zastopan propadajoči oocit, celice folikularnega epitela se pomnožijo, povečajo, postopno vdrejo v citoplazmo oocita in postanejo fagocitne.
- Na vmesni stopnji degeneracije fagocitne folikularne celice prebavijo citoplazmo oocita in zapolnijo folikel. V celicah folikla se kopiči pigment. Postopno se stopnjuje ožiljenost foliklov.
- Folikli pozne stopnje degeneracije so manjši in izrazito pigmentirani. Nakopičen pigment je melanin.
- Pigmentni skupki v vezivni steni jajčnika vključujejo melanin in so lahko rezidualni preostanek atrezij.
- Atretični folikli z amorfnim materialom so folikli v fazi regresije.

7 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo pregledali vzorce jajčnikov dvajsetih osebkov bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Primerjali smo zastopanost atretičnih foliklov (AT) v jajčnikih, določili zrelostne faze oocitov, ki so propadom podvržene, ter opisali morfološke značilnosti zastopanih AT.

Anatomsko se degenerirani oociti pri močerilu od normalnih razlikujejo po barvi, lahko tudi po obliki in velikosti. AT so marmoriranega izgleda, včasih nepravilnih oblik in različnih velikosti, saj je ta odvisna od zoritvene faze oocita, ki vstopi v degeneracijo, in stopnje procesa degeneracije.

Zaradi večje preglednosti opisa rezultatov, smo atrezije razdelili na dve morfološki obliki: atretične folikle oocitov III (AT-OIII) in atretične folikle oocitov IV (AT-OIV). Ti dve morfološki obliki smo potem še naprej razdelili na različne stopnje procesa degeneracije, ki smo jih poimenovali kot zgodnjo (A), vmesno (B) in pozno (C) stopnjo degeneracije. Pri AT-OIV smo opisali še napredno-pozno fazo, ki je v primeru AT-OIII nismo zasledili, prav tako je ne opisujejo Ogielska in sodelavci (2010). Poleg AT-OIII in AT-OIV smo v jajčnikih manjšega števila osebkov zasledili še eno morfološko obliko AT, ki so vključevali amorfn material. Uvrstili smo jih v fazo regresije atretičnega folikla (AT-R).

Za zgodnjo (A) stopnjo AT-OIII je značilno, da je citoplazma oocita vidno spremenjena, celice folikularnega epitela se pomnožijo in povečajo, vdrejo v citoplazmo oocita ter prično s fagocitozo in prebavo citoplazme oocita. Na vmesni (B) stopnji degeneracije so folikli že zapolnjeni s povečanimi spremenjenimi celicami folikularnega epitela, ki fagocitirajo citoplazmo oocita. Robne celice folikla (folikularne celice in/ali celice vezivne teke) akumulirajo pigment, ožiljenost folikla pa je izrazitejša. Mestoma se v foliklu, kjer so tudi fagociti sami degenerirali, pojavijo prazni prostori ali lumni. V pozni fazi degeneracije (C) se pigmentiranost stopnjuje, velikost folikla pa zmanjšuje.

Morfologija AT-OIV se po nekaterih značilnostih razlikuje od morfologije AT-OIII. Poleg razlik v velikosti folikla in prisotnosti rumenjakovih ploščic v citoplazmi oocita, je folikularni epitel v zgodnjem stadiju degeneracije tanjši in celice epitela niso izrazito pomnožene. Folikularne celice so sicer povečane, vendar še vedno urejene v enem sloju. Vdor fagocitnih folikularnih celic v citoplazmo oocita je izrazitejši v pecljatem delu folikla, prav tako je v tem delu citoplazma oocita hitreje fagocitirana. Predvidevamo, da se degeneracija sprva prične v enem delu folikla in se postopoma širi v preostali del. Tudi pigmentiranost foliklov AT-OIV ni tako izrazita kot pri AT-OIII. Pri AT-OIV smo zasledili folikle z obsežno vezivno teko in številnimi vezivnimi celicami, ki zapolnjujejo skoraj celoten folikel. V centru folikla so le še posamezni povečani fagociti, ki prebavljajo ostanek rumenjakovih ploščic. Tak folikel smo uvrstili v napredno-pozno stopnjo degeneracije, saj po morfologiji odstopa od pozne stopnje degeneracije foliklov AT-OIII.

V jajčniku treh osebkov smo našli atretične folikle ki vključujejo amorfn material z malo celicami. V centru takega folikla so lahko manjši skupki pigmentiranih celic. Amorfn

material v foliklih močerila se z eozinom barva rožnato in s trikromnim barvilom modro, zato predvidevamo, da gre za hialini material.

Večje število AT smo zasledili pri osebkih, ki so bili stradani daljše časovno obdobje.

V vezivu stene jajčnika pri močerilu smo našli tudi temne pigmentne skupke celic, ki so lahko rezidualni preostanek atrezij.

Zaključujemo, da degeneracija foliklov v jajčniku močerila poteka podobno kot pri ribah in dvoživkah, kjer folikularne celice proliferirajo, hipertrofirajo ter postanejo fagocitotne in prebavijo vitelogeni oocit.

8 VIRI

8.1 Citirani viri

- Beyo R.S., Divya L., Ramachandran K., Oommen O.V., Akbarsha M.A. 2010. Organisation of the corpus luteum in caecilian *Gegeneophius ramaswamii*. *Journal of Endocrinology and Reproduction* 14: 9-18
- 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
- Bizjak Mali L., Bulog B. 2011. Follicular ovarian atresia in the olm (*Proteus anguinus anguinus*). MCM 2011. September 4-9, 2011. Urbino, Italy. MCM 2011: 295-296
- Ceket D. 2011. Ultrastruktura oogonijev in zgodnjih oocit v jajčniku močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani
- Drevnick P.E., Sandheinrich M.B., Oris J.T. 2006. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquatic Toxicology* 79: 49-54
- Dumont J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136: 153-180
- Exbrayat J.M. 2009. Oogenesis and female reproductive system in Amphibia-Gymnophiona. V: *Reproduction of amphibians*. Ogielska M. (ed.). Science Publisher USA, Enfield, Jersey, Plymouth : 305-342
- Fagoto F., Maxfield F. 1994. Yolk platelets in *Xenopus* oocytes maintain an acidic internal pH which may be essential for sodium accumulation. *The Journal of Cell Biology* 125: 1047-1056
- Gilbert S.F. 2003. *Developmental biology*. 7. izdaja. Sinauer Associates, Inc., Publishers, USA
- Guraya S.S. 1989. Follicular atresia. *Indian National Science Academy*. 39, B: 311-332
- Huettenbrenner S., Maier S., Leisser C., Polgar D., Strasser S., Grusch M., Krupitza G. 2003. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutation Research* 543: 235-249
- Hunter J.R., Macewicz B.J. 1985. Measurements of spawning frequency in multiple spawning fishes. V: *An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax**. NOAA

- Technical report NMFS-36. US Department of Commerce, Springfield, VA, USA: 79-94
- Isisag Ucuncu S., Cakici O. 2009. Atresia and apoptosis in preovulatory follicles in the ovary of *Danio rerio* (Zebrafish). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 9: 215-221
- Janz D.M., McMaster M.E., Weber L.P., Munkittrick K.R., Van Der Kraak G. 2001. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58: 620-625
- Kladnik A. 2003. Citološka analiza razvoja endosperma in koreninske čepice koruze (*Zea Mays* L.). Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Linares-Casenave J., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. 2002. Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in the white sturgeon. Journal of Applied Ichthyology 18: 382-390
- Matova N., Cooley L. 2001. Review: Comparative aspects of animal oogenesis. Developmental biology 231: 291-320
- Miranda A.C.L., Bazzoli N., Rizzo E., Sato Y. 1999. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. Tissue and Cell 31: 480-488
- Ogielska M., Batrmanska J. 2009. Oogenesis and Female Reproductive System in Amphibia – Anura. V: Reproduction of Amphibians (Biological systems in vertebrates). Ogielska M. (ed.). Enfield, New Hampshire, USA, Science Publishers Inc. : 217-323
- Ogielska M., Rozenblut B., Augustynska R., Kotusz A. 2010. Degeneration of germ line cells in amphibian ovary. Acta Zoologica (Stockholm) 91: 319-327
- Palumbo A., Yeh J. 1994. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. Biology of Reproduction 51: 888-895
- Patino R., Sullivan C.V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry 26: 57-70
- Prelovšek, P.M. 2002. Histokemijska in ultrastrukturalna analiza pigmentnih celic v jetrih močerila (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela). Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani.
- Presnell J.K., Schreibman M.P., Humanson G.L. 1997. Humanson`s Animal Tissue Techniques. 5th edition. Baltimore, Johns Hopkins University Press: 572 str.
- Ross M.H., Reith E.J., Romrell L.J. 1989. The cell. In: Histology. Kimberly Kirst (ed.) Baltimore, Williams & Wilkins : 17-45.

- Santos H.B., Thome R.G., Arantes F.P., Sato Y., Bazzoli N., Rizzo E. 2008. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70: 1449-1460
- Sato Y., Bazzoli N. Rizzo E., Boschi M.B., Miranda M.O.T. 2005. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias dam, Southeastern Brazil. *River research and Applications* 21: 939-950
- Talaber I. 2008. Oogeneza pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela, Proteidae). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani
- Uribe Aranzabal M.C. 2003. The ovary and oogenesis. V: *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. Jamieson B.G.M., Sever D.M. (eds.). Enfield, New Hampshire, USA, Science Publishers Inc. :135-150
- Wood A.W. in van Der Kraak G.J. 2001. Apoptosis and ovarian function: Novel perspectives from the Teleosts. *Biology of reproduction* 64: 246-271
- Žibert U. 2010. Zoritev oocit v ovariju močerila (*Proteus anguinus anguinus*, Amphibia: Urodela, Proteidae). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani

Habič L. Morfologija atrezij v jajčniku bele podvrste močerila.

Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2012
