

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Urška ŽIBERT

ZORITEV OOCIT V OVARIJU MOČERILA
(Proteus anguinus anguinus)

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Urška ŽIBERT

ZORITEV OOCIT V OVARIJU MOČERILA
(*Proteus anguinus anguinus*)

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

OOCYTES GROWTH IN OLM OVARIUM
(*Proteus anguinus anguinus*)

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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 asist. dr. Lilijano Bizjak Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marija Štefančič
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:

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.

Žibert Urška

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 597.92:591.465.1(043.2)=163.6
KG oogeneza/ultrastruktura oocit/folikulogeneza/vitelogeneza/*Proteus anguinus*
AV ŽIBERT, Urška
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 2010
IN ZORITEV OOCIT V OVARIJU MOČERILA (*Proteus anguinus anguinus*)
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 114 str., 3 pregl., 40 sl., 75 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Ovarije močerila (*Proteus anguinus anguinus*) smo pregledali s stereolupo, svetlobnim mikroskopom in presevnim elektronskim mikroskopom. Oogoniji in previtelogene oocyte I. in II. zoritvene faze so stalna zaloga jajčnih celic za zoritve. Vitelogene oocyte pa se v ovariju pojavljajo neodvisno od letnih časov. Zoritev jajčnih celic ni sezonska. V ovarijih daljših in masivnejših osebkov so oocyte zrelejših zoritvenih faz. Z zorenjem oocyte se spreminja lega in oblika jedra, nagubanost jedrne ovojnice, število in velikost jedrc. Jedro oocit I. zoritvene faze ima izrazita območja ev- in heterokromatina, v jedru II. zoritvene faze so posamične kromosomske niti, za jedra III. in IV. zoritvene faze so značilni krtačasti kromosomi. Rumenjakove ploščice se pojavijo v zgodnji IV. zoritveni fazi. Zorijo in povečujejo se v smeri od roba proti središču citoplazme. Z nadaljnjim zorenjem oocit se povečuje količina rumenjakovih ploščic, ki zapolnijo citoplazmo oocit V. zoritvene faze. Vitelogene oocyte V. zoritvene faze so najbolj zrela faza, ki pa še ni preovulacijska. Količina maloštevilnih lipidnih kapelj oogonija se z zorenjem oocit izrazito poveča. Lipidne kaplje in rumenjakove ploščice so v IV. zoritveni fazi urejene slojevito. Oocyte IV. zoritvene faze so enakomerno rjavo pigmentirane. Pigmentne granule se pojavijo že v oocitah III. zoritvene faze. Z zorenjem oocyte se spreminjata število ter oblika celic folikularnega epitela. V III. zoritveni fazi se pojavi ožiljenost vezivne teke ter vitelinska ovojnica, ki se v IV. zoritveni fazi diferencira v zunanji homogeni sloj ter notranji sloj cone radiate. Degenerirajoče vitelogene oocyte imajo marmoriran videz. Pojavljajo se najmanj trije morfološki tipi atretičnih teles.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC 597.92:591.465.1(043.2)=163.6
CX Oogenesis/Ultrastructure/Oocytes/Folliculogenesis/Vitellogenesis/*Proteus anguinus*
AU ŽIBERT, Urška
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 2010
TI OOCYTES GROWTH IN OLM OVARIUM (*Proteus anguinus anguinus*)
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 114 p., 3 tab., 40 fig., 75 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Ovaries of olm (*Proteus anguinus anguinus*) were examined by light and transmission electron microscopy. Oogonia and previtellogenic oocytes are a constant stock of oocytes for growth. Vitellogenic oocytes occur in ovarium independently of seasons; olm reproductive cycle is not annual. Oocytes of more mature stages are present in the ovaries of longer and heavier specimens. Location and shape of nucleus, nuclear envelope sacculation and the size and number of nucleoli are changed with oocyte growth. Nucleus of stage I oocytes have clearly visible areas of eu- and heterochromatin. Individual chromatids are characteristic for the nucleus of stage II oocytes and lampbrush chromosomes for the oocytes nucleus of stage III and IV. Yolk platelets appear in the cytoplasm of early stage IV oocytes. They mature and increase in size, from near the surface into deeper portions of the oocyte. Vitellogenesis becomes more intense with oocyte maturation. In the stage V oocytes yolk occupies the whole cytoplasm. The most mature oocytes are stage V oocytes, which are not yet in a preovulatory stage. A small number of lipid droplets present in oogonium increased with oocyte growth. In the stage IV lipid droplets and yolk platelets are positioned in layers. Uniform brown pigmentation is characteristic for stage IV oocytes, due to melanin granules located in a band just beneath the oolema. Pigment granules appear in stage III oocytes. The shape and number of follicular cells change with oocyte growth. In the stage III, the vitelline envelope and capillaries in the thecal layer appeared. In the stage IV, vitelline envelope layer differentiates into the outer homogenous layer and the inner zona radiata layer. Degenerating vitellogenic oocytes have a marbled appearance. Vitellogenic atretic bodies have at least three different morphological forms.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 REPRODUKTIVNI CIKEL	2
2.1.1 Celoletni ali »all – year round« reproduktivni cikel	2
2.1.2 Polletni ali »biannual« reproduktivni cikel	3
2.1.3 Sezonski ali »annual« reproduktivni cikel	3
2.2 IZVOR IN ZORITEV JAJČNIH CELIC	4
2.2.1 Klična linija	4
2.2.2 Mitotske delitve oogonijev	5
2.2.3 Mejoza	6
2.2.4 Krtačasti kromosomi	7
2.2.5 Jedrce	9
2.2.6 Jedrna ovojnica	10
2.3 DIFERENCIACIJA IN POJAVLJANJE CITOPLAZEMSKIH STRUKTUR JAJČNE CELICE	12
2.3.1 Vitelogeneza in nastanek rumenjakovih ploščic	12
2.3.1.1 Funkcija rumenjakovih ploščic	12
2.3.1.2 Razporeditev rumenjakovih ploščic pri vretenčarjih	12
2.3.1.3 Kemijska sestava vitelogenina	12
2.3.1.4 Sinteza vitelogenina in njegov privzem v oocito	13
2.3.1.5 Zoritev rumenjakeve ploščice	14
2.3.1.6 Časovna in prostorska razporeditev rumenjakovih ploščic	15
2.3.2 Lipidne kaplje	16
2.3.3 Pigmentne granule	17
2.4 VLOGA FOLIKULARNEGA OVOJA	19
2.4.1 Folikularni epitel	19
2.4.1.1 Izvor folikularnih celic in folikulogeneza	19
2.4.1.2 Diferenciacija folikularnega epitela	20
2.4.1.3 Stiki med celicami folikularnega epitela	21
2.4.1.4 Značilnosti mikro- in makrovilov	21
2.4.2 Zgradba in funkcija vitelinske ovojnice	22
2.4.2.1 Vloga vitelinske ovojnice	22

2.4.2.2	Kemijska sestava vitelinske ovojnice	23
2.4.2.3	Izvor in nastanek vitelinske ovojnice	23
2.4.3	Sloj vezivne teke	24
2.4.4	Zunanji epitel	25
2.5	ATRETIČNO TELO	26
2.5.1	Vzrok nastanka atretičnega telesa	26
2.5.2	Nastanek atretičnega telesa	26
2.5.3	Prisotnost atretičnih foliklov	27
3	MATERIALI IN METODE DELA	29
3.1	MATERIAL	29
3.2	METODE	31
3.2.1	Pregled ovarijev s stereolupo	31
3.2.2	Parafinske rezine	31
3.2.2.1	Fiksacija tkiva in priprava parafinskih rezin	31
3.2.2.2	Histološka barvanja in histokemijski testi v parafinskih rezinah	32
3.2.3	Poltanke in ultratanke rezine	34
3.2.3.1	Fiksacija tkiva in priprava poltankih in ultratankih rezin	34
3.2.4	Mikroskopiranje	35
4	REZULTATI	36
4.1	REPRODUKTIVNI CIKEL	36
4.1.1	Faze zoritve jajčnih celic	36
4.1.2	Zrelost ovarija in letni čas	39
4.2	SPREMEMBE JEDRNIH STRUKTUR MED OOGENEZO	44
4.2.1	Jedro oogonija	44
4.2.2	Jedro oocyte I. zoritvene faze	46
4.2.3	Jedro oocyte II. zoritvene faze	47
4.2.4	Jedro oocyte III. in IV. zoritvene faze	48
4.2.5	Jedro oocyte V. zoritvene faze	49
4.3	SPREMEMBE CITOPLAZEMSKIH STRUKTUR MED OOGENEZO	50
4.3.1	Rumenjakove ploščice	50
4.3.1.1	Rumenjakove ploščice v oociti IV. zoritvene faze	50
4.3.1.2	Rumenjakove ploščice v oociti V. zoritvene faze	51
4.3.1.3	Zrele rumenjakove ploščice in njihove predstopnje	52
4.3.2	Lipidne kaplje	54
4.3.2.1	Lipidne kaplje v oogonijih	54
4.3.2.2	Lipidne kaplje v oociti II. zoritvene faze	56
4.3.2.3	Lipidne kaplje v oociti III. zoritvene faze	58
4.3.2.4	Lipidne kaplje v oociti IV. zoritvene faze	58
4.3.3	Pigmentne granule	61
4.4	SPREMEMBE FOLIKULARNEGA OVOJA	64
4.4.1	Prefolikularne celice oogonija	64
4.4.2	Folikularni ovoj oocyte I. in II. zoritvene faze	66
4.4.3	Folikularni ovoj oocyte III. in IV. zoritvene faze	68
4.4.4	Folikularni ovoj v V. zoritveni fazi	71
4.5	ATRETIČNA TELESKA	72
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	76
5.1	RAZPRAVA	76

5.1.1	Reprodukivni cikel	76
5.1.1.1	Faze zoritve jajčnih celic	76
5.1.1.2	Letno spreminjanje zoritvenih faz v ovariju.....	77
5.1.1.3	Povezava dolžine in mase telesa z zrelostjo ovarija	78
5.1.2	Strukturne značilnosti oocit v različnih fazah zoritve	79
5.1.2.1	Jedro in oogeneza	79
5.1.2.2	Zgradba in razporeditev rumenjakovih ploščic v oocitah.....	80
5.1.2.3	Struktura in razporeditev lipidnih kapljic	83
5.1.2.4	Razporeditev pigmentnih granul.....	84
5.1.2.5	Razvoj in diferenciacija folikularnega ovoja med oogenezo.....	85
5.1.2.6	Nastanek in diferenciacija atretičnega telesa	87
5.2	SKLEPI.....	90
6	POVZETEK.....	92
7	LITERATURA	95
7.1	CITIRANI VIRI.....	95
7.2	ELEKTRONSKI VIRI.....	103

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Podatki o poskusnih živalih	30
Preglednica 2. Morfološki izgled in velikosti oocit posameznih zoritvenih faz.....	37
Preglednica 3. Zrelost ovarijev močerila skozi leto.....	40

KAZALO SLIK

Slika 1. Model strukture krtačastega kromosoma v diplotenu.	8
Slika 2. Gnezdo oogonijev v steni ovarija.	38
Slika 3 a - c. Oocita V. zoritvene faze premera 3380 μm	38
Slika 4 a-b. Povezanost med dolžino telesa in zrelostjo ovarija (a.) ter maso telesa in zrelostjo ovarija (b.).	42
Slika 5. Povezanost dolžine ter mase telesa z zrelostjo ovarija.	43
Slika 6 a - b. Jedro oogonija	44
Slika 7 a - d. Oogoniji v procesu mitotske delitve.	45
Slika 8. Oocyte I. in II. zoritvene faze (OI in OII).	46
Slika 9 a - b. Struktura jedra v oociti I. in II. zoritvene faze ter njuna centralna lega v oociti	47
Slika 10. Struktura jedra oocyte III. zoritvene faze in njegova centralna lega v oociti.	48
Slika 11 a - b. Struktura jedra oocyte IV. zoritvene faze.	49
Slika 12 a - b. Ob plazmalemi ležeče jedro (N) oocyte V. zoritvene faze.	49
Slika 13 a - b. Razporeditev rumenjakovih ploščic v vitelogeni oociti zgodnje IV. zoritvene faze.	50
Slika 14 a - b. Razporeditev rumenjakovih ploščic v vitelogeni oociti pozne IV. zoritvene faze.	51
Slika 15 a - c. Rumenjakove ploščice oocyte V. zoritvene faze.	52
Slika 16 a - b. Robna citoplazma vitelogene oocyte IV. zoritvene faze.	53
Slika 17 a - b. Centralna citoplazma vitelogene oocyte IV. zoritvene faze.	54
Slika 18 a - c. Oogonij (OG).	55
Slika 19. Previtelogena oocita II. zoritvene faze premera 360 μm	56
Slika 20 a - d. Lipidne kaplje v citoplazmi previtelogene oocyte II. zoritvene faze.	57
Slika 21 a - b. Vitelogena oocita III. zoritvene faze premera 890 μm	58
Slika 22 a - d. Slojevita ureditev citoplazme vitelogene oocyte IV. zoritvene faze.	60
Slika 23 a - b. Prečni prerez animalnega pola vitelogene oocyte IV. zoritvene faze.	61
Slika 24 a - c. Razporeditev pigmentnih granul v oociti III. in IV. zoritvene faze.	62
Slika 25. Pigmentne granule v oociti V. zoritvene faze	63
Slika 26 a - b. Razporeditev prefolikularnih celic v gnezdu oogonijev.	64
Slika 27 a - b. Prefolikularna celica oogonija.	65
Slika 28. Medcelični prostor (ip) med oolemo (plo) in plazmalemo prefolikularne celice (plfc).	65
Slika 29 a - b. Sploščen folikularni epitel okoli oocyte.	66
Slika 30 a - b. Folikularni ovoj oocyte II. zoritvene faze.	67
Slika 32 a - b. Mikrovili in makrovili v perivitelinem prostoru (PVP).	68
Slika 33. Primerjava folikularnega ovoja II. in III. zoritvene faze.	69
Slika 34 a - c. Folikularni ovoj oocyte IV. zoritvene faze.	70
Slika 35 a - b. Folikularni ovoj oocyte V. zoritvene faze.	71
Slika 36. Marmoriran videz degenerirajočih vitelogenih oocit premera oocit od 1150 do 1620 μm	72

Slika 37. Atretično telo premera 1430 μm iz zunanje celične kapsule (Ka) in notranjega ovulacijskega prostora (OP).	73
Slika 38 a - b. Ovulacijski prostor atretičnega telesa pod večjo povečavo.	73
Slika 38. Atretično telo premera 2800 μm z nespremenjeno obliko rumenjakovih ploščic (RP).	74
Slika 40 a - c. Večcelično atretično telo premera 490 μm	75

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

* - osebk, ki niso bili hranjeni 14 – 18 mesecev

1 - robni sloj citoplazme

2 - povezovalni sloj citoplazme

3 - lipidni sloj citoplazme

4 - centralni sloj citoplazme

bMv - baza mikrovila

C cyt - centralna citoplazma

ch - kromosomi

cyt - citoplazma jajčne celice

cyt fc - citoplazma folikularne celice

del. v. - delitveno vreteno

drp - degenerirajoče rumenjake ploščice

ER - endoplazemski retikulum

eri - eritrociti

evc - evkromatin

f - intermediarni filamenti

ge - zunanji epitel

gra - granulociti

hc - heterokromatin

Hve - homogeni sloj vitelinske ovojnice

inm – notranja jedrna membrana

ip - medcelični prostor

K - kristalinsko telo

k - kripta

Ka - kapsula atretičnega telesa

kc - krvna celica

L - lipidne kaplje

Lo - lipidne kaplje pravilne oblike

Lp - elektronsko gost plašč lipidne kaplje

Lz - lipidna kaplje nepravilne oblike

m - mitohondrij

mf - intermediarni filamenti

Mav - makrovil

Mv - mikrovil

MV - multivezikularno telo

MV1 - zgodnje multivezikularno telo

MV2 - pozno multivezikularno telo

My - mielinsko telo
N - število osebkov v vzorcu
N - jedro jajčne celice
n - jedrce
ne - jedrna ovojnica
Nfc - jedro celice folikularnega epitela in prefolikularne celice
Nge - jedro celice zunanega epitela
NOG - jedro oogonija
Nt - celice vezivne teke
OI – V - oocita od I. do V. zoritvene faze
OG - oogonij
OGi - oogonij v interfazi
onm – zunanja jedrna membrana
OP - ovulacijski prostor atretičnega telesa
p - pigmentna granula
P cyt - robni del citoplazme
Plcf - plazmalema celice folikularnega epitela
plo - plazmalema jajčne celice
pnp – perinuklearni prostor
PV - plaščni vezikel
PVi - nastajajoč plaščni vezikel
PVP - perivitelini prostor
RP - rumenjakeve ploščice
RP1 - primordialna rumenjakeva ploščica
RP2 - zrela rumenjakeva ploščica
Rpm - majhne rumenjakeve ploščice
Rpp - rumenjakeve ploščice v robni citoplazmi
RPs - rumenjakeve ploščice v centralni citoplazmi
RPv - velike rumenjakeve ploščice
rL - rob lipidne kaplje
sloj PG - sloj pigmentnih granul
t - sloj vezivne teke
tfc - transformirane celice folikularnega epitela
V - vakuoliziran sloj citoplazme
v - vezikel
va - vakuola
ve - vitelinska ovojnica
VER - vezikel endoplazemskega retikuluma
ZR - cona radiata

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Morfologija jajčnika močerila *Proteus anguinus* in klasifikacija razvijajočih se oocit je opisana v diplomskem delu Ive Talaber (2008). Na podlagi izgleda, velikosti in morfoloških lastnosti oocit so določene štiri faze zoritve oocit, dve previtelogeni fazi in dve v začetni fazi vitelogeneze. S tem diplomskim delom nadaljujemo raziskave oogeneze močerila in dopolnujemo manjkajoče podatke dosedanjih raziskav. Rezultati bodo pripomogli k razumevanju strategije zoritve in diferenciacije jajčnih celic pri naši endemični jamski dvoživki.

1.2 CILJ NALOGE

Namen naloge je dopolniti manjkajoče podatke zoritve jajčnih celic močerila in preveriti že znane rezultate dosedanjega dela (Talaber, 2008). Opisali bomo ultrastrukturo zoritvenih faz jajčnih celic, predvsem oogonijev in oocit v vitelogeni fazi. Preverili bomo korelacijo med velikostjo osebkov in zrelostjo jajčnika ter korelacijo med letnimi časi in zrelostjo oocit.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Skladno z zoritvijo in diferenciacijo jajčnih celic pričakujemo ultrastrukturne spremembe v jedru in citoplazmi, kot odraz aktivne sinteze in skladiščenja proteinov, ribosomov, tRNA, mRNA, morfogenetskih faktorjev in nutrientov, ki so potrebni za zgodnji razvoj in diferenciacijo celic embrija. Zaradi konstantnih razmer v jamskem habitatu pričakujemo, da zoritev jajčnih celic ni sezonska. Jajčne celice lahko dozori kadarkoli tekom leta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 REPRODUKTIVNI CIKEL

Vretenčarji so razvili različne vedenjske in fiziološke strategije, da bi zagotovili reprodukcijski uspeh in posledično povečali »fitnes« oz. uspešnost pretoka genov (Roff, 1992, cit. po Jessop in sod., 2004). Pri dvoživkah sta način in čas reprodukcije odvisna od eksogenih dejavnikov kot tudi od endogenih (hormonskih) mehanizmov. Med eksogene dejavnike sodijo temperaturne spremembe v okolju, prehod iz sušnega v deževno obdobje, sprememba dolžine dneva ter izrazita sprememba v dostopnosti hrane (Pancharatna in Saidapur, 1985). Galgano (1949, cit. po Brizzi in Corti, 2006) je med njimi izpostavil prevladujoč vpliv sezonskih in lokalnih temperaturnih sprememb. Kot kompromis med številnimi selekcijskimi pritiski so se pri dvoživkah razvili različni reproduktivni vzorci (Duellman in Trueb, 1985).

V ugodnem delu sezone poteka cikel, ki obsega dozoritev gamet, ovulacijo zrelih jajčnih celic, parjenje, rast in razvoj embria ter larve (Halliday, 1990, cit. po Brizzi in Corti, 2006). Reproductivna cikličnost je zelo odvisna od klimatskih razmer habitata (Sretarugsa in sod., 2001).

Reproduktivni cikli dvoživk so lahko celoletni, polletni ali sezonski (Duellman in Trueb, 1985).

2.1.1 Celoletni ali »all – year round« reproduktivni cikel

Celoletni ali »all – year round« cikel imajo dvoživke, ki živijo v tropih, kjer so klimatske razmere, kot so vlažnost, temperatura okolja ter dolžina dneva, dokaj stalne. Dvoživke s celoletnim ciklom se lahko neprekinjeno razmnožujejo, saj imajo skozi vse leto ugodne pogoje za reprodukcijo (Pancharatna in Saidapur, 1985). Takšen cikel reprodukcije je

poznan za brezrepce *Rana cyanophlyctis* (Pancharatna in Saidapur, 1985), *Rana erythraea* z Bornea ter *Bufo melanostictus* iz Singapurja (Sretarugsa in sod., 2001).

2.1.2 Polletni ali »biannual« reproduktivni cikel

Polletni ali »biannual« reproduktivni cikel je značilen za dvoživke, ki živijo v habitatih z izmenjujočim se suhim in vlažnim obdobjem leta. Glavna reproduktivna sezona sovpada z monsunskim deževjem. Takšen reproduktiven cikel je prisoten pri brezrepcih *Bufo regularis* iz Tanzanije in *Rana tigerina* s Tajske (Sretarugsa in sod., 2001). Bienalni reproduktivni cikel imajo še sleporili ter del repatih dvoživk zmernega klimatskega pasu (Duellman in Trueb, 1985).

2.1.3 Sezonski ali »annual« reproduktivni cikel

Sezonski ali »annual« reproduktivni cikel je prisoten pri brezrepih in delno tudi pri repatih dvoživkah zmernega klimatskega pasu (Duellman in Trueb, 1985). Vse dvoživke s takšno obliko cikla so podvržene vsakoletnim ciklom fizioloških sprememb, ki vključujejo rast in regresijo gonad ter hormonske spremembe, ki so povezane z reproduktivno aktivnostjo. Ovariji so lahko v neaktivnem stanju tudi do 10 mesecev v letu, zorenje oocit pa je omejeno na dva oz. tri mesece pred parjenjem. Pariti se začno takoj ko so okoljske razmere ugodne, kar je največkrat pogojeno z dvigom temperature oz. spomladanskim dežjem (Pramoda in Saidapur, 1984, cit. po Pancharatna in Saidapur, 1985).

2.2 IZVOR IN ZORITEV JAJČNIH CELIC

Oogeneza je proces zorenja in diferenciacije jajčne celice. Sánchez in Villecco (2003) sta proces oogeneze razdelila v štiri zaporedne faze:

- faza diploidnih primordialnih zarodnih celic,
- faza nekaj generacij diploidnih oogonijev,
- faza diploidnih primarnih oocit, ki vstopijo v I. mejotsko delitev,
- faza haploidnih sekundarnih oocit, ki vstopijo v II. mejotsko delitev in so ob koncu pripravljene na potencialno oploditev.

2.2.1 Klična linija

V času razvoja ovarija vanj vstopajo primordialne zarodne celice (PGC). Izvirajo iz zarodne plazme oocite, ki jo sestavljajo proteini in molekule RNA (vključno z veliko in malo mitohondrijsko rRNA ter mRNA) (Gilbert, 2006). Morfološko pa zarodno plazmo sestavljajo germinalne granule, ki so elektronsko goste fibrilarno - granularne strukture (Matova in Cooley, 2001). Skupaj z mitohondriji ter lokalizirano mRNA (Xcat2 in Xpat) tvorijo Balbianijevo telo ali mitohondrijski oblak (Wilk in sod., 2005). Njegova naloga je transportirati germinalne granule in lokalizirano mRNA iz objedrnega območja v vegetalni korteks oocite (Zelanowska in sod., 2007). To vrsto transporta poimenujemo pot METRO ali »Message transport organizer«. Po zaključeni migraciji se Balbianijevo telo razprši (Wilk in sod., 2005), determinante zarodne plazme pa kot otočki, zasidrani z aktinskimi filamentmi, ostanejo v citoplazmi vegetalnega pola (Kloc in sod., 2004, cit. po Wilk in sod., 2005). Klične determinante zarodne plazme se med brazdanjem razdelijo le v določene blastomere in nazadnje v določene celice zarodka, ki postanejo primordialne zarodne celice (Houston in King, 2000, cit. po Chang in sod., 2004).

Pri brezrepcih so primordialne zarodne celice zgoščene v posteriornem delu embrionalnega črevesa. Kasneje med tvorbo abdominalne votline potujejo po dorzalnem mezenteriju v gonadni greben, dokler ne dosežejo razvijajočih se gonad (Browder in sod., 1980; Gilbert,

2006). Pri repatih dvoživkah primordialne zarodne celice nastanejo pod induktivnim vplivom mezoderma, v gonade prispejo po drugačni poti kot primordialne zarodne celice brezrepcev, in sicer skozi somatska tkiva (Gilbert, 2006).

2.2.2 Mitotske delitve oogonijev

Primordialne zarodne celice se začno po vstopu v razvijajoči ovarij mitotsko deliti. Nastajajo diploidne zarodne celice ali oogoniji (Pepling in sod., 1999, cit. po Matova in Cooley, 2001).

Pri ribah in dvoživkah (Tokarz, 1978; Guraya, 1976, Dodd, 1977, cit. po Aranzábal, 2003; Gülsoy, 2007) so oogoniji v steni ovarija prisotni skozi vse reproduktivno obdobje. Na začetku vsakega reproduktivnega cikla z mitotskimi delitvami omogočijo razvoj nove kohorte oocit, saj novo nastali oogoniji kontinuirano vstopajo v redukcijsko delitev (Sánchez in Villecco, 2003). Pri pticah in sesalcih pa vsi oogoniji v ovariju že v zgodnjem ontogenetskem razvoju osebka sočasno vstopijo v proces redukcijske delitve (Aranzábal, 2003).

V ovariju večine dvoživk so oogoniji razporejeni med zrelejšimi oocitami. Drugačno razporeditev oogonijev pa zasledimo v ovariju nekaterih brezrepcev, kjer so oocyte glede na zoritvene faze razdeljene po režnjih (Sánchez in Villecco, 2003). Ko posamični primarni oogoniji vstopijo v zaporedne mitotske delitve, nastanejo skupine med seboj povezanih oogonijev. Imenujemo jih sekundarni oogoniji (Coggins, 1973; Norris, 1997, cit. po Aranzábal, 2003), njihove skupke pa ciste ali gnezda (Matova in Cooley, 2001). Zaradi običajno sočasnih delitev število oogonijev v gnezdu narašča eksponentno in se z vsakim ciklom podvoji. V cistah ne poteče popolna citokineza, saj hčerinske celice ostanejo med seboj povezane s stabilnimi medceličnimi mostički.

2.2.3 Mejoza

Oocita je popolnoma izoblikovana še pred koncem redukcijske delitve, kljub temu pa sta procesa oogeneze in mejotske delitve močno povezana med seboj (Browder, 1980). Proces mejoze ali redukcijske delitve je v gametogenezi ključen za vzdrževanje ravnovesja genetskega materiala v zigoti, saj se v procesu redukcijske delitve poleg genetske rekombinacije reducira dedni material, posledično oocita po ovulaciji vsebuje le haploiden set kromosomov (Alberts in sod., 2002).

Po zadnji mitotski delitvi oogonija nastopi faza sinteze DNA, tako da ima primarna oocita z vstopom v redukcijsko delitev podvojen dedni material. Vsak kromosom je sestavljen iz dveh sestrskih kromatid, ki so med delitvijo povezane z makrotubuli delitvenega vretena. Primarna oocita nato vstopi v profazo I. mejotske delitve, ki jo delimo na pet faz: leptoten, zigoten, pahiten, diploten in diakineza (Alberts in sod., 2002; Gilbert, 2006).

V leptotenu je kromatin organiziran v dolge, tanke vrvice, zaradi česar ni mogoče ločiti posamičnih kromosomov med seboj. Zaradi replikacije dednega materiala je vsak kromosom sestavljen iz dveh sestrskih kromatid. Kromatin je močno podvržen zgoščevanju.

V fazi zigoten pride do parjenja homolognih kromosomov. Njihovo parno ureditev imenujemo sinapsa in je značilna le za redukcijsko delitev. Homologna kromosoma se med seboj povežeta z aksialnimi proteini sinaptonemičnega kompleksa v bivalent, ki je tako sestavljen iz vseh štirih kromatid, kar imenujemo tetrada.

V fazi pahiten se kromatide skrajšajo ter odebelijo. Povezani kromatidi homolognih kromosomov se na določenih mestih prekrizata ter izmenjata genetski material, kar imenujemo prekrizanje oz. *crossing over*. Posledica je nastanek hibridne kromatide, ki vsebuje DNA obeh homolognih kromosomov.

Sledi faza diploten, kjer začne sinaptonemični kompleks razpadati, homologna kromosoma pa se razdvajata. Na mestih kiazme (*chiasmata*), kjer je prišlo do prekrižanja, ostaneta združena. Fazo diplotena še posebej zaznamuje visoka stopnja sinteze RNA.

Diakineza je zadnja faza profaze I. mejotske delitve. V njej se homologna kromosoma ločita in ostajata povezana le s konicami kromatid. Ob koncu se razgradi jedrna ovojnica, kromosomi pa začno potovati do metafazne plošče.

V nadaljevanju mejoze razpade jedro ali germinalni vezikel (*germinal vesicle breakdown*). V metafazi se dedni material redukcijsko razdeli. Ker je metafazna plošča pomaknjena proti enemu polu, se v telofazi citoplazma med dvema hčarinskima celicama ne porazdeli enakomerno. Glavnino citoplazme dobi sekundarna oocita, preostanek pa manjša polocita. V II. mejotski delitvi se v ekvatorialni ravnini ločita haploidna kromosoma, ki sta rekombinirani kromatidi.

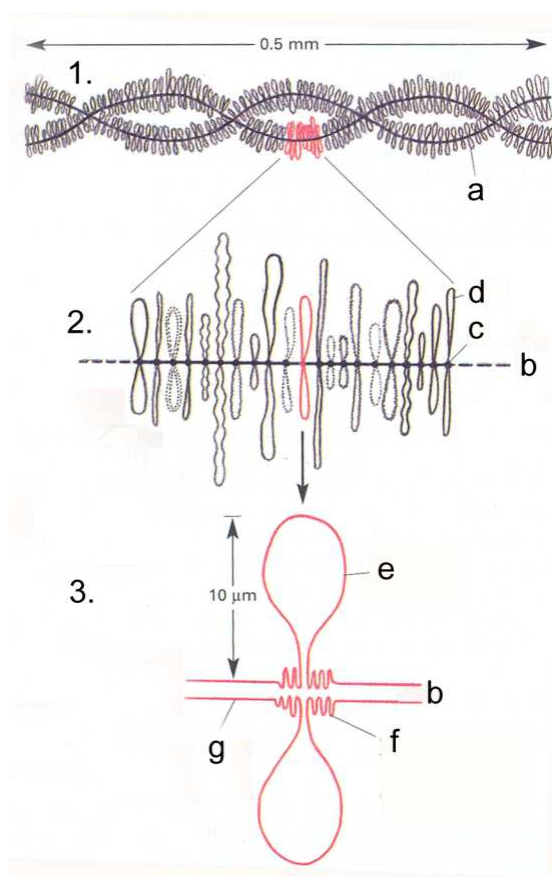
2.2.4 Krtačasti kromosomi

Krtačasti kromosomi (*lampbrush chromosomes*) so specializirane oblike kromosomov, ki jih najdemo v jedrih profaze I., v diplotenu mejotske delitve pri kostnicah (Kjebsu in Kryvi, 1989; Baumeister, 1973, cit. po Selman in sod., 1993; Zelazowska in sod., 2007), dvoživkah (Sánchez in Villecco, 2003; Prado in sod., 2004) in ptičih (Solovei in sod., 1996). V jedrih sesalcev, iglokožcev ter v jedrih žuželk, kjer so v ovarijih poleg oocit prisotne še celice dojilje (*nurse cells*), krtačastih kromosomov ni (Browder in sod., 1980). Krtača, ki se uporablja za čiščenje oljenk, ima posebne zankaste ščetine, in zaradi podobnosti s kromatinskimi zankami so kromosome po njej tudi poimenovali (Browder in sod., 1980).

V jedru profaze I., v diplotenu mejotske delitve so vidne tanke, vzporedno ležeče sestrške kromatide homolognih kromosomov (sl. 1), ki skupaj tvorita navidezno os kromosoma (Brachet, 1979). Sestavljena je iz izmenjujočih se kromomer ter interkromomernih regij (Browder in sod., 1980). Gostota kromatina se ob koncu interkromomerne regije na prehodu v kromomerno regijo še bolj poveča. Kromatin sestrskih kromatid se nato

dekondenzira v zankah, ki se lateralno iztezajo iz kromatid. Zanki, ki si na sestrskih kromatidih ležita nasproti, sta simetrično oblikovani. Na prehodu v naslednjo interkromomerno regijo pa se kromatin ponovno zgosti (Browder in sod., 1980).

Pri dvoživkah je v setu kromosomov lahko do deset tisoč zank, vendar se te nahajajo le v predelu z dekondenzirano DNA, ki zavzema v genomu le do 5 % (Brachet, 1979). V tem predelu na zankah poteka intenzivna sinteza RNA (Old in sod., 1977, cit. po Sánchez in Villecco, 2003). Zanka predstavlja večkratno transkriptivno enoto, kjer imajo lahko vsi prepisi enotno polarnost, transkriptivne enote pa se lahko prepisujejo tudi v različnih smereh (Browder in sod., 1980). Na novo sintetizirana heterogena RNA se poveže s proteini, tako da se ob zanki kopiči ribonukleoproteinski matriks, ki se ob koncu transkripcije z nje sprostí. Molekula mRNA lahko preide skozi jedrno ovojnico le, če se pred transportom v citoplazmo oocite razreže.



Slika 1. Model strukture krtačastega kromosoma v diplotenu. 1. Homologna krtačasta kromosoma. 2. Izsek kromosoma. 3. Kromosom pod večjo povečavo, ki prikazuje sestrski kromatidi. a – kiazma. b – os kromosoma. c – kromomera. d – zanka. e – dekondenziran kromatin zanke. f – visoko kondenziran kromatin kromomere. g – interkromomera (povzeto po Alberts in sod., 2002: 218).

Izjemno dolžino transkriptov RNA (nekaj kb) na zankah krtačastih kromosomov bi lahko pojasnili z načinom »read-through« transkripcije, ki pa ni namenjena samo takojšnji translaciji v proteine. Le 20% celotne na krtačastih kromosomih sintetizirane mRNA se uporabi v procesu sinteze proteinov, preostalih 80% pa predstavlja zalogo informacij za kasnejši embrio (Browder in sod., 1980). V procesu citoplazemske lokalizacije različne mRNA zavzamejo točno določena mesta v citoplazmi oocite, s pomočjo katerih je determinirana usoda delečih se celic v embriu (Capco in Jeffery, 1982, cit. po Sánchez in Villecco, 2003). Visoka stopnja transkripcije po mnenju Davidsona (1986, cit. po Browder in sod., 1980) pripomore tudi k vzdrževanju stabilne zaloge mRNA, saj se slednja v oociti tudi razgrajuje. Na krtačastih kromosomih se razen mRNA sintetizirajo tudi večje količine ribosomske RNA (Sánchez in Villecco, 2003).

Ob koncu srednje vitelogene faze oogeneze dvoživk se krtačasti kromosomi kondenzirajo ter potujejo proti centralnemu delu jedra (Dumont, 1972), kmalu zatem pa niso več opazni (Prado in sod., 2004).

2.2.5 Jedrce

Jedrca ali nukleolusi so ena bolj opaznih jedrnih struktur. Jedrce je skupek makromolekul, kot so geni rRNA, predhodnje stopnje in zrele ribosomske molekule RNA (rRNA), encimi za procesiranje rRNA, proteinske podenote ribosomov ter deloma že sestavljeni ribosomi (Alberts in sod., 2002).

Ena od pomembnejših nalog oogeneze je sinteza in kopičenje ribosomov v citoplazmi oocite, saj z njimi bodoči embrio lahko izdelava svoje lastne ribosome in si že v zgodnjem razvoju zagotovi zadostno količino proteinov, ki jih potrebuje za rast in razvoj (Browder in sod., 1980). Stopnja sinteze ribosomov je tisočkrat večja v oociti kot v somatski celici (Wormington, 1988, cit. po Browder in sod., 1980). V najhitrejši fazi rasti oocite se vsako sekundo izdelava okoli 300 ribosomov (Scheer, 1973, cit. po Sánchez in Villecco, 2003).

Visoko stopnjo sinteze rRNA omogoči pomnožitev genov rRNA v oociti, ki se nahajajo na kromosomih in zunaj njih, v jedrcih (Sánchez in Villecco, 2003). Po končani transkripciji

se rRNA nakopiči v kompaktnem, homogenem jedrcu. Ribonukleoproteini in rRNA kmalu disociirajo z njegove površine (Abdalla in Cruz - Landim, 2003), se preoblikujejo v dve podenoti, ki prečita jedrno poro ter se v citoplazmi povežeta v ribosom (Alberts in sod., 2002).

V jedru oogonijev kostnic največkrat omenjajo prisotnost le enega velikega jedra (Bruslé in Bruslé, 1978; Abdalla in Cruz Landim, 2003; Gülsoy, 2007), pri dvoživkah pa se njihovo število giblje od ena do tri (Guraya, 1965; Coggins, 1973; Tourte in sod., 1981).

V rastoči previtelogeni oociti se pomnožena jedra razporedijo po obodu jedra in se dotikajo notranje jedrne membrane (Franke in Scheer, 1970, cit. po Sánchez in Villecco, 2003; Zelazowska, 2007). Jedra so okrogla (Sánchez in Villecco, 2003) ali pa nepravilnih oblik (Dumont, 1972; Coggins, 1973). Intenzivno povečanje rRNA poteka v pahitenu in diplotenu profaze I. mejotske delitve (Sánchez in Villecco, 2003). V srednji vitelogeni fazi manjša jedra potujejo proti centralnemu delu jedra, nekatera velika jedra pa ostanejo na njegovem obodu (Dumont, 1972).

2.2.6 Jedrna ovojnica

Jedrna ovojnica je struktura, sestavljena iz dveh koncentričnih membran, ki obdaja jedro (Alberts in sod., 2002). Tik pod notranjo jedrno membrano je iz omrežja intermediarnih filamentov sestavljen sloj jedrne lamine. Njegova naloga je vzdrževanje jedrne oblike (Alberts in sod., 2002).

Jedrna ovojnica je v oogoniju nenagubana (Bruslé in Bruslé, 1978), v kasnejših previtelogenih zoritvenih fazah pa je pri ribah (Zelazowska in sod., 2007) in dvoživkah (Sretarugsa in sod., 2001; Sánchez in Villecco, 2003) pravilno oblikovana ali le rahlo nagubana. Izrazito se naguba v previtelogeni fazi kortikalnih alveolov pri kostnicah (Srijunngam in Wattanasirmkit, 2001) in pri dvoživkah pred pojavom rumenjakovih ploščic v zgodnji vitelogeni fazi (Dumont, 1972, Sretarugsa in sod., 2001). Nagubanost se pri dvoživkah obdrži do konca srednje vitelogene faze (Guraya, 1965; Dumont, 1972) ali do preovulacijske faze (Aranzábal, 2003).

Jedrna ovojnica je pri vseh evkariotih preluknjana s kompleksi jedrnih por (Alberts in sod., 2002), ki so nameščene na mestih, kjer se notranja in zunanja jedrna membrana stikata (Browder in sod., 1980). Jedrno poro sestavljajo nukleoproteini, ki so urejeni v pravilno osemkotno strukturo. V njegovi sredini se nahaja en sam ali več odprtih vodnih kanalčkov, ki omogočajo majhnim, v vodi topnim molekulam prosto difuzijo (Alberts in sod., 2002). Dvosmeren transport skozi jedrno poro je natančno reguliran. Iz citoplazme v jedro prehajajo določeni proteini, v nasprotni smeri pa potujejo molekule RNA in ribonukleoproteini (Brachet, 1979).

2.3 DIFERENCIACIJA IN POJAVLJANJE CITOPLAZEMSKIH STRUKTUR JAJČNE CELICE

2.3.1 Vitelogeneza in nastanek rumenjakovih ploščic

2.3.1.1 Funkcija rumenjakovih ploščic

Rumenjakove ploščice jajčne celice nastanejo med oogenezo v procesu vitelogeneze. Predstavljajo zalogo aminokislin, ogljikovih hidratov, lipidov, fosfatov in ionov (Fagotto in Maxfield, 1994). So skladišče energije in strukturnih komponent za rast in razvoj embria (Pātino in Sullivan, 2002).

2.3.1.2 Razporeditev rumenjakovih ploščic pri vretenčarjih

Kopičenje rumenjakovih ploščic v zoreči oociti je značilno za večino oviparnih vrst (Karasaki, 1963; Komasaki, 1987, cit. po Villecco in sod., 1999). Količina nakopičenega rumenjaka v zrelih oocitah pa se razlikuje glede na tip jajc (Gilbert, 2006). Zrela oocita dvoživk kot primer mezolecitalnega tipa zrele jajčne celice, vsebuje zmerno količino rumenjaka (Gilbert, 2006). Rumenjak v zreli oociti žabe krepljčarke *Xenopus laevis* zavzame 50% volumna citoplazme (Fagotto in Maxfield, 1994).

2.3.1.3 Kemijska sestava vitelogenina

Vitelogenin je fosfolipoprotein in je predstopnja rumenjakovih proteinov. Sestavljen je iz dveh podenot molekulske mase 180 - 240 kDa (Stifani in sod., 1990, cit. po Villecco in sod., 1999).

Pri ribah, dvoživkah in ptičih se pojavljajo enake ali zelo sorodne sekvence v genetskem zapisu za vitelogenin (Vg gen), torej je evolucijsko zelo konzervativna molekula (Sánchez in Villecco, 2003).

Po translaciji mRNA Vg gena se nastali proteinski del vitelogenina v jetrnih celicah modificira s fosforilacijo ter glikozilacijo (Han in sod., 2006). Pri kostnicah vitelogenin razen proteinske komponente vsebuje tudi 20 % lipidov oz. fosfolipidov (fosfatidilholin, fosfatidil – etanolamin), ki so strukturni deli membran (Weigard, 1996, cit. po Pätino in Sullivan, 2002).

2.3.1.4 Sinteza vitelogenina in njegov privzem v oocito

Pod vplivom nevroendokrine osi hipotalamus – hipofiza – ovariji, ki se aktivira z ugodnimi okoljskimi in endogenimi faktorji, se spodbudi sinteza vitelogenina v jetrih. Hipofizni gonadotropin folikel-stimulirajoči hormon (FSH) vpliva na sintezo estradiola – 17 β v celicah folikularnega epitela ovarija. Ta sproži sintezo vitelogenina v jetrih in njegovo sproščanje v krvni obtok (Specker in Sullivan, 1994, cit. po Pätino in Sullivan, 2002).

Njegovo sočasno prisotnost v jetrih in ovariju so dokazali pri ribah (Prisco in sod., 2007), dvoživkah (Herbener in sod., 1984), plazilcih (Tada in sod., 2004) in ptičih (Wachmut in Jost, 1976, cit. po Han in sod., 2006).

Vitelogenin se kopiči v plazmi in potuje do ovarija, kjer prehaja skozi medcelične prostore endotelijskih celic krvnih kapilar. Potuje med fibroblasti in kolagenimi vlakni vezivne teke, kjer se molekule naključno razpršijo. Vitelogenin prehaja skozi bazalno lamino, ki leži na distalni strani folikularnih celic in skozi medcelične prostore folikularnega epitela ter pore vitelinske ovojnice do ooleme (Sánchez in Villecco, 2003). Pri kostnici *Chirostoma humboldtianum* (Selman in Wallace, 1986, cit po Cárdenas in sod., 2008) so dokazali, da prehajajo molekule vitelogenina v celice folikularnega epitela ter iz njih z endocitotskimi vezikli.

Med vitelogenezo je površina ooleme nagubana v številne mikrovile, med katerimi se nahajajo specifični receptorji za vitelogenin (Sánchez in Villecco, 2003). Receptorji so na zunajcelični strani ooleme, na katero je vezan glikokaliks (Wallace in sod., 1983, cit. po Browder in sod., 1980). Na citoplazemski strani vezavnega mesta za vitelogenin se nahajajo molekule klatrina, zato vdolbinico plazmaleme s specifičnimi receptorji imenujemo klatrinski jarek (Browder in sod., 1980). S selektivno vezavo vitelogenina se začne klatrinski jarek poglobljati v periferno citoplazmo. Invaginacije, ki vsebujejo vezan vitelogenin, se nato odcepijo od ooleme ter oblikujejo klatrinske plaščne vezikle (Sánchez in Villecco, 2003).

Transportni proces za privzem vitelogenina v oocito je receptorsko posredovana endocitoza (Dumont 1978, cit. po Sretarugsa in sod., 2001) oziroma mikropinocitotna oblika endocitoze (Sánchez in Villecco, 2003). Privzem vitelogenina v oocito nadzirajo gonadotropni hormoni (Holland in Dumont, 1975, Tyler in sod., 1999, cit. po Pätino in Sullivan, 2002).

2.3.1.5 Zoritev rumenjakove ploščice

Klatrinski vezikli se v kortikalni citoplazmi zlivajo med seboj ali s cevastimi endosomi Golgijevega aparata (Browder in sod., 1980). V endosomih vezikli zgubijo klatrinski plašč. Molekule vitelogenina se ločijo od receptorjev mikropinocitotskega vezikla (Browder in sod., 1980).

Z zlivanjem endosomov nastane multivezikularno telo, ki vsebuje majhne vezikle (Wall in Patel, 1987) in elektronsko goste mase, ki se sčasoma povečujejo (Sánchez in Villecco, 2003). V multivezikularnem telesu poteka proteolitska cepitev vitelogenina v rumenjakove proteine z encimom katepsinom, značilnim za vse oviparne tetrapode (Retzek in sod., 1992, cit. po Pätino in Sullivan, 2002). S cepitvijo nastaneta rumenjakova proteina lipovitelin in fosvitin (Wiley in sod., 1981, cit. po Villecco in sod., 1999). Fosvitin je fosfoprotein, lipovitelin pa sodi med lipofosfoproteine (Browder in sod., 1980).

Ko se oba rumenjaka proteina kondenzirata in tvorita kristalinsko telo, nastane primordialna rumenjaka ploščica (Browder in sod., 1980). Osrednje telo kristalinske strukture je pri nekaterih repatih in brezrepah dvoživkah oblikovano v heksagonalne in kvadratne mreže (Karasaki, 1963), v katerih rumenjaki proteini zavzamejo prostorsko najbolj ugodno obliko (Fagotto in Maxfield, 1994). Kristalinsko telo obkroža vezikularni, granularni ali amorfni material (Kessel in Ganion, 1980). V tej fazi rumenjake ploščice tudi privzemajo lipidne kapljice, ki so jih predhodno obkrožale. Ob privzemu pride do modifikacije lipidnih kapljic tako, da njihove strukture niso več prepoznavne (Villicco in sod., 1999). Pri nekaterih dvoživkah opisujejo primordialne rumenjake ploščice kot nepravilno oblikovana telesa, ki se nahajajo na periferiji oocite in so brez kristalinskih teles (Dumont, 1972).

Medsebojno zlivanje primordialnih ploščic in njihov transport v središčne dele oocite prispevajo k nastanku zrele rumenjake ploščice (Dumont, 1972). Pri žabi *Rana tigerina* je zrela rumenjaka ploščica urejena v centralno ležeče, elektronsko svetlo, kompaktno kristalinsko telo in elektronsko gostejši periferni del (Sretarugsa in sod., 2001), ki je obdan z membrano (Karasaki, 1963).

Vse od nastanka pa do proteolize v embriju je rumenjaka ploščica zaradi stalno nizkega pH stabilna citoplazemska struktura (Fagotto in Maxfield, 1994).

2.3.1.6 Časovna in prostorska razporeditev rumenjakovih ploščic

Rumenjake ploščice se v citoplazmi oocite pojavijo v vitelogeni fazi oogeneze. V zgodnji fazi vitelogeneze se v oocitah dvoživk na periferiji tvori ozek obroč rumenjakovih ploščic (Aranzábal, 2003). V srednji vitelogeni fazi se nalaganje rumenjakovih ploščic stopnjuje, saj zapolnijo celoten volumen oocite. Pri žabi krempeljčarki *Xenopus laevis* je to faza najhitrejšega kopičenja rumenjakovih ploščic (Dumont, 1972). Manjše rumenjake ploščice so na animalnem polu oocite, večje pa na vegetalnem (Aranzábal, 2003). Asimetrična razporeditev je posledica aktivne translokacije večjih ploščic iz animalne hemisfere v vegetalno. V proces je vključen citoskelet oocite (Browder in sod., 1980). Na

periferiji vegetalne hemisfere se rumenjakeve ploščice aktivno ne translocirajo, temveč rastejo na račun zlivanja z mikropinocitoznimi vezikli (Gilbert, 2006).

V pozni vitelogenezi in v preovulacijski fazi se zaradi izjemnega kopičenja rumenjakovih ploščic izrazito poveča velikost oocite. Ooplazma je popolnoma zapolnjena z rumenjakovimi ploščicami, ki so na vegetalni hemisferi večje in številnejše (Aranzábal, 2003).

Pri močerilu *Proteus anguinus* se rumenjak pojavi v začetku IV. zoritvene faze oogeneze kot tanek periferni obroč rumenjakovih ploščic, ki se postopoma razširi v središčno citoplazmo (Talaber, 2008). Po Dumontu (1972) spada opisana zoritvena faza v zgodnje obdobje vitelogeneze.

2.3.2 Lipidne kaplje

Največ literature je o lipidnih kapljah v oocitah kostnic (Guraya, 1965; Kjebsu in Kryvi, 1989; Pätino in Sullivan, 2002; Sarasquete in sod., 2002; Özlem in Sema, 2007; Cárdenas in sod., 2008). Opisujejo jih tudi v oocitah dvoživk (Guraya, 1965; Spornitz in Kress, 1973; Brachet, 1979; Sharon in sod., 1997) in sesalcev (Landim - Alvarenga in Alvarenga, 2006).

Lipidne kaplje v oocitah kostnic predstavljajo metabolno energijsko zalogo embria (Weigand, 1996, cit. po Pätino in Sullivan, 2002).

Za pelaška jajca nekaterih vrst kostnic (npr. morski ostriži) navajajo izjemno veliko lipidnih kapelj (Pätino in Sullivan, 2002). Lipidne kaplje zavzemajo polovico ali več volumna ooplazme. Nekateri avtorji so mnenja, da pripomorejo k boljši plovnosti oocite (Özlem in Sema, 2007), drugi pa lipidnim kapljam pripisujejo funkcijo zaloge hranil (Hemming in Buddington, 1988, Momsen in Walsh, 1988, cit. po Sarasquete in sod., 2002; Weigand, 1996, cit. po Pätino in Sullivan, 2002).

Lipidni vključki v oocitah kostnic vsebujejo večinoma nevtralne lipide, kot so trigliceridi, voski in estri, kjer so zaestrene večinoma mono-nenasičene maščobne kisline (Weigand, 1996, cit. po Pätino in Sullivan, 2002).

Izvor lipidov v citoplazmi oocit kostnic ni popolnoma jasen. Prat in njegovi sodelavci (1998, cit. po Pätino in Sullivan, 2002) navajajo, da se prenašajo po krvnem obtoku v obliki lipoproteinov zelo nizke gostote (VLDL). Vežejo se na lipoproteinske receptorje v žilnem endoteliju ovarija, kjer se z lipoproteinsko lipazo hidrolizirajo v proste maščobne kisline (Le Men in sod., 1999, cit. po Pätino in Sullivan, 2002). Skozi folikularni epitel se nato transportirajo v obliki mikropinocitoznih veziklov (Williamson, 1960, cit. po Kessel in Panje, 1968; Kjebsu in Kryvi, 1989).

Cárdenas in njegovi sodelavci (2008) opisujejo pri kostnici *Chirostoma humboldtianum* nalaganje lipidnih kapljic v previtelogeni fazi sočasno s pojavom kortikalnih alveolov. Kopičenje se nadaljuje tudi v vitelogeni fazi. Lipidne kaplje postajajo med zorenjem oocite zaradi medsebojnega zlivanja tudi vse večje. Pri tuni *Thunnus thynnus* zavzemajo lipidi v srednji fazi oogeneze večino citoplazme, razen regije ob jedru (Sarasquete in sod., 2002).

Pri dvoživkah so lipidne kaplje opisane za previtelogene oocite navadnega pupka *Triturus vulgaris* (Spornitz in Kress, 1973) in krastače *Bufo stomaticus* (Guraya, 1965). Zastopane so v manjšem številu. V oocitah zgodnje vitelogene faze se pri navadnem pupku *Triturus vulgaris* njihova koncentracija poveča, tako da so rumenjakove ploščice popolnoma obdane z lipidnimi kapljicami (Spornitz in Kress, 1973). Kopičenje lipidnih kapelj opisujejo tudi za vitelogene oocite močerada *Salamandra salamandra infraimaculata* (Sharon in sod., 1997) in krempljičarke *Xenopus laevis*. Pri krempljičarki se med zorenjem oocite pojavi asimetrična razporeditev lipidov (Brachet, 1979). Njihova količina upada od animalnega proti vegetalnemu polu.

2.3.3 Pigmentne granule

Pigmentne granule ali melanosomi se pojavljajo pri oocitah dvoživk, ki jajca odlagajo na mesta, izpostavljena direktni dnevni svetlobi (Browder in sod., 1980). Pigment je namenjen zaščiti jedra in citoplazme pred škodljivim, mutagenim UV sevanjem.

Melanosomi v oocitah dvoživk nastanejo v procesu melanogeneze in vključujejo temno rjav ali črn pigment melanin (Wartenberg, 1962, cit. po Eppig, 1970; Spornitz in Kress, 1973; Browder in sod., 1980). Proces melanogeneze opisujeta Spornitz in Kress (1973) za oocito navadnega pupka *Triturus vulgaris*. V citoplazmi previtelogene oocyte so enakomerno razporejeni sprva prosojni pigmentni vezikli okroglih do ovalnih oblik. Vsebujejo malo elektronsko gostih delcev. Z njihovim medsebojnim zlivanjem nastanejo premelanosomi, predstopnja pigmentnih granul oz. organelov melanosomov (Wartenberg, 1962, cit. po Eppig, 1970; Spornitz in Kress, 1973). Z zlivanjem pigmentnih vezikov postaja vsebina premelanosoma vse bolj elektronsko gosta. Ko je premelanosom velik 0,6 μm in popolnoma zapolnjen z visoko elektronsko gostimi delci, se preoblikuje v melanosom. Melanosomi so v robni citoplazmi oocyte.

Premelanosomi se pri krempljičarki *Xenopus laevis* pojavijo v robni citoplazmi oocyte zgodnje vitelogene faze (Dumont, 1972), pri navadnem pupku *Triturus vulgaris* pa so prisotni že v pozni previtelogeni fazi (Spornitz in Kress, 1973).

Količina pigmenta se izrazito poveča v oocitah srednje vitelogene faze ter se enakomerno razporedi vzdolž površine oocyte (Dumont, 1972; Sretarugsa in sod, 2001). Oocita je zato na anatomskem nivoju enakomerno pigmentirana. Pigmentne granule so tik pod kortikalnimi granulami (Dumont, 1972).

V pozni vitelogeni in preovulacijski fazi razporeditev pigmenta v oociti dvoživk ni več enakomerna. Pigmentne granule so predvsem v robni citoplazmi animalne hemisfere, zaradi česar je le ta rjavo obarvana. Vegetalna hemisfera pa je obarvana svetleje, saj je v njeni robni citoplazmi le manjše število pigmentnih granul (Taylor in Hadley, 1972; Browder in sod., 1980).

2.4 VLOGA FOLIKULARNEGA OVOJA

Oocyte vretenčarjev so popolnoma obdane s folikularnim ovojem (Bou - Resli, 1974), ki je vez med oocito in zunanjim okoljem (Kessel in Panje, 1968). Njegova naloga je zagotoviti primerno okolje za rast in razvoj oocite (Matova in Cooley, 2001). Pri dvoživkah si od ooleme navzven k površini folikla sledijo štiri sloji: acelična vitelinska ovojnica, folikularni epitel, vezivna teka in površinski epitel (Sánchez in Villecco, 2003).

2.4.1 Folikularni epitel

Folikularni epitel je oociti najbližji celični sloj folikla. Pri kostnicah (Cárdenas in sod., 2008) in dvoživkah (Guraya, 1965) je epitel enoslojen, pri sesalcih pa je slojev več (Franchi, 1960). Nekateri avtorji pojmujejo izraz granulozne celice kot sinonim za celice folikularnega epitela, pri drugih pa se izraz nanaša predvsem na celice večslojnega folikularnega epitela pri sesalcih (Guraya, 1965).

Celice folikularnega epitela imajo aktivno vlogo v procesih oogeneze, vitelogeneze, sinteze steroidnih hormonov, transportu določenih snovi ter pri nastanku vitelinske ovojnice (Browder in sod., 1980; Srijunngam in sod., 2005).

2.4.1.1 Izvor folikularnih celic in folikulogeneza

Germinalni epitel v steni nastajajočega ovarija repatih dvoživk sestavljajo somatske in zarodne celice (Spornitz in Kress, 1973). Iz zarodnih celic se kasneje razvijejo oogoniji, somatske celice pa se preoblikujejo v prefolikularne celice, ki so v neposrednem stiku s plazmalemo oogonija.

Celice folikularnega epitela in oocyte so izpostavljene visoko koordiniranemu zaporedju sprememb, ki so nujne za nastanek zrele oocite (Sánchez in Villecco, 2003). Sočasno z vstopom oogonija v oogenezo poteka tudi folikulogeneza (Tokarz, 1978). Slednja se

zaključí, ko je oocita popolnoma obdana z ovojem prefolikularnih celic. Te se kasneje diferencirajo v folikularne celice ter bazalno lamino, ki ločuje folikularne celice od sloja vezivne teke (Aranzábal, 2003).

2.4.1.2 Diferenciacija folikularnega epitela

V zgodnjih previtelogenih fazah dvoživk je enoslojni folikularni epitel sestavljen iz maloštevilnih ploščatih celic, ki so v neposrednem stiku z oolemo (Dumont, 1972; Aranzábal, 2003). Količina citoplazme celic folikularnega epitela in raznolikost organelov v citoplazmi je pri kostnicah in brezrepnih dvoživkah zelo majhna (Srijunngam in sod., 2005; Sánchez in Villecco, 2003).

Pri kostnicah v pozni previtelogeni fazi ali fazi kortikalnih alveolov poteka preoblikovanje celic folikularnega epitela iz ploščatih oblik v kubične (Srijunngam in sod., 2005), medtem ko so celice folikularnega epitela pri repatih dvoživkah (Kessel in Panje, 1968) in hrustančnicah (Prisco in sod., 2007) še vedno ploščate oblike. Pri hrustančnici *Torpedo marmorata* imajo jedra ploščato oblikovanih celic folikularnega epitela razločno vidne skupke heterokromatina, v slabo razviti citoplazmi pa je še vedno malo organelov (Prisco in sod., 2007). V tej fazi se pri dvoživkah (Aranzábal, 2003) in kostnicah (Srijunngam in sod., 2005) močno razširi medecelični ali periviteliní prostor.

V zgodnji vitelogeni fazi oogeneze dvoživk se oblika ploščatih celic folikularnega epitela spremeni v kubično, vretenaste oblike jedra pa v ovalne (Kessel in Panje, 1968). Pri kostnicah (Srijunngam in sod., 2005) in dvoživkah (Guraya, 1965) se izrazito poveča tudi število celic folikularnega epitela. Sprememba oblike celice vodi do povečanja volumna jedra in citoplazme (Guraya, 1965). Raznolikost organelov v citoplazmi celic folikularnega epitela se poveča (Srijunngam in sod., 2005), poleg tega pa se v njej začno kopičiti lipidne kaplje (Kessel in Panje, 1968). Oblika in številčnost celic folikularnega epitela se v srednji in pozni vitelogeni fazi ne spreminja veliko (Aranzábal, 2003).

2.4.1.3 Stiki med celicami folikularnega epitela

Folikularne celice so pri dvoživkah med seboj povezane z dezmosomi (Sretarugsa in sod., 2001), pri sesalcih pa je ta oblika celičnega stika prisotna med celicami folikularnega epitela v preantralnih fazah oogeneze, kasneje v antralnih fazah pa so celice folikularnega epitela med seboj povezane z dezmosomi in s presledkovnimi stiki (Albertini in Anderson, 1974).

2.4.1.4 Značilnosti mikro- in makrovilov

Ko transport z mikropinocitozo snovi, ki poteka neposredno med plazmalemo oocite in folikularnih celic, zaradi premajhne površine obeh ne zadošča več razvojnim potrebam zoreče oocite, se površina oocite in celic folikularnega epitela poveča (Odor, 1960). Na apikalni površini obeh celičnih tipov pojavijo prstasti izrastki plazmaleme. Značilni so za kostnice (Anderson, 1967), dvoživke (Sánchez in Villecco, 2003) in sesalce (Franchi, 1960).

Citoplazemske izrastke, ki izraščajo s površine oocite v perivitelini prostor, imenujemo mikrovili, tiste s površine celic folikularnega epitela pa makrovili (Matova in Cooley, 2001). Površina oocite se pri ameriški leopardovki *Rana pipiens* poveča kar za petintridesetkrat (Kemp, 1956, cit. po Odor, 1960) in pri navadni krastači *Bufo bufo* za enajstkrat (Dick in sod., 1970).

Pri kostnicah (Srijungam in sod., 2005) in dvoživkah (Sretarugsa in sod., 2001) se mikro- in makrovili oblikujejo v pozni previtelogeni fazi. Po navedbah nekaterih avtorjev (Sánchez in Villecco, 2003) so mikrovili krajši, tanjši in elektronsko manj gosti kot pa makrovili. Ti se zaradi svoje dolžine lahko stikajo z oolemo prek dezmosomov in presledkovnih stikov. (Albertini in Anderson, 1976, Gilula in sod., 1978, cit. po Browder in sod., 1980). Makrovili lahko oolemo upognejo v kortikalno citoplazmo (Sánchez in Villecco, 2003). Drugi avtorji pa razlik med mikro in makrovili ne opisujejo (Prado in sod., 2004).

V zgodnjih fazah vitelogeneze se število in dolžina mikro in makrovilov povečuje (Dick in sod., 1970), saj se mora zagotoviti zadosten privzem vitelogenina (Sretaruga in sod., 2001). V pozni vitelogeni fazi se mikrovili začno krčiti, postajajo vse krajši in manjštevlni (Dick in sod., 1970). Pri kostnicah imajo mikrovili v fazi krčenja tudi večjo elektronsko gostoto (Anderson, 1967).

2.4.2 Zgradba in funkcija vitelinske ovojnice

Oocyte so pri večini vrst živali obdane z acelično ovojnico (Dumont in Brummet, 1985, cit. po Hyllner in Haux, 1994), vendar jo različno poimenujejo. Pri nevretenčarjih in vretenčarjih se acelični sloj med oocito in celicami folikularnega ovoja imenuje vitelinska ovojnica, razen pri sesalcih, kjer oocito obdaja debelejši sloj zone pellucide (Gilbert, 2006). Za nekatere raziskovalce imajo pojmi vitelinska ovojnica, cona radiata, cona pellucida enak pomen (Guraya, 1965). V tej diplomski nalogi bomo za aceličen sloj okrog oocyte močerila uporabljali izraz vitelinska ovojnica.

2.4.2.1 Vloga vitelinske ovojnice

Pri nezrelih oocitah vitelinska ovojnica onemogoča penetracijo spermija in s tem oocito ščiti pred prezgodnjo oploditvijo (Sánchez in Villecco, 2003). Ob zrelosti pa ima ključno vlogo pri vrstno specifičnem prepoznavanju spermija (Gilbert, 2006). Ob vezavi na specifični receptor vitelinske ovojnice v spermiju poteče akrosomska reakcija (Barrisone in sod., 2002), s katero lahko preči vitelinsko ovojnico in s tem doseže površino ooleme (Gilbert, 2006). Ob oploditvi vitelinska ovojnica sodeluje pri preprečitvi polispermije (Sánchez in Villecco, 2003). V embriogenezi omogoča zaščito pred neugodnimi mehanskimi vplivi, izsušitvijo, hitro spremembo pH ter deluje baktericidno in fungicidno (Dumont in Brummel, 1985, cit. po Hyllner in Haux, 1994). Zaradi nje imajo mikrovili pravokotno lego glede na površino oocyte. Povečana absorpcijska površina oocyte je tako maksimalno izkoriščena (Sánchez in Villecco, 2003).

2.4.2.2 Kemijska sestava vitelinske ovojnice

Vitelinska ovojnica je sulfoniran glikoproteinski polimer v obliki gela (Green, 1997). Nekateri glikoproteini vitelinske ovojnice krempeljčarke *Xenopus laevis* so homologni glikoproteinom vitelinske ovojnice domače miši *Mus musculus* (Tian in sod., 1997, cit. po Wessel in sod., 2001).

2.4.2.3 Izvor in nastanek vitelinske ovojnice

Izvor materiala vitelinske ovojnice je nejasen. V literaturi zasledimo 3 hipoteze o izvoru vitelinske ovojnice. Po prvi hipotezi k sintezi in sekreciji materiala vitelinske ovojnice največ doprinese oocita (Pinto in sod., 1985, cit. po Sánchez in Villecco, 2003). Prado in sod. (2004) pri nastanku vitelinske ovojnice izpostavljajo pomen celic folikularnega epitela. Obstaja tudi hipoteza o njunem skupnem prispevku k nastanku omenjenega sloja folikularnega ovoja (Cabada in sod., 1996; Hope in sod., 1963, cit. po Aranzabal, 2003). Pri kostnicah se ob porastu estradiola v krvni plazmi proteini vitelinske ovojnice začno sintetizirati tudi v jetrnih celicah (Hyllner in Haux, 1994; Tyler in sod., 1999, cit. po Pätino in Sullivan, 2002).

Sinteza proteinov vitelinske ovojnice poteka na ribosomih zrnatega endoplazemskega retikuluma v robni citoplazmi oocite. Proteini se v njem razporedijo v transportne vezikle, v katerih potujejo h Golgijevemu aparatu, kjer se z glikozilacijo strukturno modificirajo (Porter, 1964, cit. po Anderson, 1967; Cross in Mercer, 1993). V eksocitoznem veziklu Golgijevega aparata, ki potuje proti oolemi, proteini vitelinske ovojnice niso polimerizirani, saj se v takšni obliki v medceličnem prostoru ne bi bili sposobni zlit z vsebino drugih veziklov (Green, 1997).

Material vitelinske ovojnice se začne kopičiti v perivitelinem prostoru kot posamični izolirani snopi drobnih filamentov, ki se kasneje zlijejo med seboj in nastane aceličen pas vitelinske ovojnice (Sánchez in Villecco, 2003). Sloj se z zorenjem oocite močno odebeli ter diferencira. Pri dvoživkah nastaneta dva sloja vitelinske ovojnice: brezstrukturni homogeni sloj ter cona radiata, ki jo prečijo mikro in makrovili (Wischnitzer, 1964). Dva sloja vitelinske ovojnice sta prisotna tudi pri kostnicah: debelejši, filamentozni notranji sloj

ter tanjši, granularni zunanji sloj (Dumont in Brummet, 1985, Guraya, 1986, cit. po Hyllner in Haux, 1994).

V pozni vitelogeni fazi se mikrovili umaknejo iz cone radiate, ki se posledično skrči. Med vitelinsko ovojnico in oocito tako nastane prostor, ki ga Wischnitzer (1964) poimenuje perivitelini prostor. Guraya (1965) pa ta pojem perivitelinega prostora enači z medceličnim prostorom, kjer se nahaja vitelinska ovojnica. V tej diplomski nalogi bo pomen termina perivitelini prostor povzeli po Gurayi (1965).

2.4.3 Sloj vezivne teke

Sloj vezivne teke leži distalno od bazalne lamine folikularnega epitela oocite (Kjebisu in Kryvi, 1989). Na drugi strani, proti površini folikla, pa je omejen z zunanjim epitelom (Sretarugsa in sod., 2001). Nekateri raziskovalci pojem vezivne teke razširijo še na zunanji epitel (Guraya, 1965), vendar bomo termin v tej diplomski nalogi uporabljali le za sloj vezivne teke. Pri plazilcih, ptičih in sesalcih je vezivni sloj intenzivneje razvit kot pri ribah in dvoživkah (Guraya, 1965).

Pri kostnicah sloj teke sestavljajo ploščati fibroblasti z malo citoplazme ter večje celice s številnimi organeli (Srijunngam in Wattanasirmit, 2001; Srijunngam in sod., 2005). Pri žabi krepljičarki *Xenopus laevis* v previtelogeni fazi oogeneze sloj vsebuje fibroblaste, kolagenska vlakna in kapilare (Dumont, 1972; Aranzábal, 2003). Od pozne previtelogene faze dalje se pri dvoživkah stopnjuje ožiljenost sloja (Dumont, 1972; Aranzábal, 2003; Prado in sod., 2004).

V endotelnih celicah kapilar vezivne teke so pogosti mikropinocitozni vezikli. Njihovo število v kapilarnem endotelu nakazuje intenzivnost vnosa snovi iz zunanjega okolja v folikularno ovojnico (Kessel in Panje, 1968).

2.4.4 Zunanji epitel

Serozni sloj folikla ali zunanji epitel obdaja vezivno teko in je zunanji sloj folikla (Wischnitzer, 1966, cit. po Kessel in Panje, 1968). Izrazi zanj so še epitel kapsule ovarija (ovarian sac epithelium) in peritonealni epitel (Anderson in Yatvin, 1970, cit. po Dumont, 1972). Od zgodnjih zoritvenih faz dalje ga grade preproste ploščate celice, ki so med seboj povezane z dezmosomi (Kessel in Panje, 1968).

2.5 ATRETIČNO TELO

Folikle, ki so podvrženi procesom degeneracije, imenujemo atrezije (Devine in sod., 2000). Opisali so jih pri številnih vrstah vretenčarjev (Aranzábal, 2003).

2.5.1 Vzrok nastanka atretičnega telesa

Atretična telesa nastanejo zaradi nenadnega padca koncentracije testosterona in estradiola v plazmi (Linares – Casenave in sod., 2002). Nekatere študije so pokazale povezavo med številom atrezij v ovariju in stradanjem (Dumont, 1972; Matova in Cooley, 2001) ali nedostopnostjo hranil v okolju in pomanjkanjem vitelogenina v plazmi (Wallace in sod., 1981).

Tudi pri belem jesetru *Acipenser transmontanus* je pogostost atrezij večja ob pomanjkanju hranil ter ob neugodnih temperaturah okolja, neugodnem fotoperiodnem režimu in ob slabši kvaliteti vode (Linares - Casenave in sod., 2002).

2.5.2 Nastanek atretičnega telesa

Spremembe, ki zajamejo atretični folikel, lahko razdelimo na spremembe, ki prizadenejo citoplazemske organele, folikularni ovoj in tiste, ki nastanejo z nepravilno segmentacijo oocite (Vazquez - Nin in Sotello, 1967; Linares - Casenave, 2002). V procesu nastanka atretičnega telesa so granulozne celice podvržene programirani celični smrti. Degeneracija same oocite ne poteka ne s klasičnim procesom apoptoze ne z nekrozo, saj ima v primerjavi z njima drugačen sprožilec celične smrti, signalno prenašalno pot ter mehanizem razgradnje (Devine in sod., 2000).

Proces nastanka atretičnega telesa vitelogenih oocit natančno opisujejo pri belem jesetru *Acipenser transmontanus* (Linares – Casenave in sod., 2002). Razdeljen je v tri faze: zgodnjo, intermediano ter napredno fazo. Zgodnjo fazo nastanka atretičnih teles

prepoznamo po marmoriranem videzu oocit. Opazen je razpad vitelinske ovojnice, ki jo fagocitirajo granulozne celice, ki so morfološko podobne makrofagom. Zaradi razgraditve jedrne ovojnice so v citoplazmi vidni skupki jedrnega materiala. Velikost oljnih vključkov se poveča zaradi zlivanja maščobnih kapljic. Ob koncu zgodnje faze nastanka atretičnega telesa je atretično telo razdeljeno na kolageno kapsulo ali zunanji celični sloj ter ovulacijski prostor. V slednjega vdrejo transformirane granulozne celice ali fibroblastom podobne celice.

V intermediani fazi nastanka atretičnega telesa vitelinske ovojnice ni več. Sloj teke hipetrofira, vendar je še vedno ožiljen. V granuloznih celicah so zaradi lizosomske prebave, ki se vrši v njih, prisotne pigmentne granule. V ovulacijski prostor se infiltrirajo krvne celice. Razgradijo se rumenjake plosčice (Linares – Casenave in sod., 2002).

V napredni fazi nastanka atretičnega telesa fagocitne celice vakuolizirajo citoplazmo oocite. Večcelično atretično telo, ki je v ovariju prisotno še nekaj mesecev, vsebuje lipidne in pigmentne vključke. Sčasoma se celice v njem skrčijo. Sočasno poteka intenzivno kopičenje melaninskega pigmenta. Njegov nastanek je povezan z degenerativnimi procesi fagocitoznih celic (Linares – Casenave in sod., 2002).

2.5.3 Prisotnost atretičnih foliklov

Za ključno linijo so razen delitev značilne tudi celične smrti, ki se odvijajo po prostorsko in časovno značilnih vzorcih (Matova in Cooley, 2001).

Oocyte so izpostavljene degenerirajočim procesom v vseh stopnjah zorenja (Aranzábal, 2003). Jørgesen (1973) opisuje veliko številčnost atrezij previtelogenih foliklov pri dvoživkah (cit. po Tokarz, 1978).

Pri številnih vrstah dvoživk so atretične oocyte prisotne skozi vse leto, vendar njihovo število naraste zaradi nezadostne koncentracije gonadotropnih hormonov tik pred sezono parjenja in v paritvenem obdobju (Saidapur, 1978, cit po Pancharatna in Saidapur, 1985). Degenerirani folikli se kmalu nadomestijo z novo kohorto oogonijev, ki vstopijo v

oogenezo. Nadomestitev je opazna predvsem pri vrstah, kjer oocite v ovariju zorijo sinhrono (Pancharatna in Saidapur, 1985).

Pri kostnici *Trachurus declivis* se pogostost atrezij povečuje z zrelostjo folikla (Marshall in sod., 2003). Podobna opažanja so zasledili pri zorenju oocit žabe krempličarke *Xenopus laevis*, kjer so vitelogene oocite ob začetku kopičenja rumenjaka še posebno izpostavljene degenerativnim procesom (Dumont, 1972).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

V našo raziskavo smo vključili 32 naključno izbranih samic nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) (pregl. 1). Žrtvovanje živali ter fiksacijo njihovih tkiv so izvedli raziskovalci v preteklih letih v sklopu raziskav skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

V tej diplomski nalogi je raziskava ovarija močerila potekala na morfološkem, histološkem ter ultrastrukturnem nivoju. V morfološko raziskavo smo vključili ovarije 4 osebkov (P149, P150, P165 in P192), v histološko pa ovarije vseh 32 osebkov. V slednjo smo vključili tudi preparate ovarijev 10 osebkov (P132, P151, P152, P169, P171, P181, P187, P4 - 6), ki jih je v svoji diplomski nalogi uporabila Iva Talaber (2008). Iz zbirke histoloških preparatov skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev smo uporabili material 7 osebkov (P007, P90, PE, PS1 - 4), vendar pri petih osebkih niso znani podatki o dolžini in masi telesa. Za namene raziskovanja jajčnih celic s transmisijskim elektronskim mikroskopom smo uporabili dele ovarijev 3 osebkov (P165, P168 in P176).

Telesna dolžina osebkov, zajetih v naš vzorec, je znašala od 185 mm do 285 mm, telesna masa pa od 9,05 g do 33,4 g (pregl. 1). Osebki so bili izlovljeni na različnih lokalitetah in v različnih letnih časih (pregl. 1). Vse živali so bile do fiksacije vzdrževane v speleološkem laboratoriju na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, v akvarijih z vodnimi črpalkami in filtri, pri temperaturi 10° C in v stalni temi. Hranjene so bile enkrat tedensko s postranicami (Crustacea: Amphipoda).

Preglednica 1. Podatki o poskusnih živalih

Oznaka ose bka	Lokaliteta	Datum fiksacije	Letni čas fiksacije	Dolžina ose bka (mm)	Masa živali (g)
P 007	Planinska jama	07.10.1977	jesen	240	/
P 090	Planinska jama	25.05.1984	pomlad	235	/
P131	Planinska jama	15.12.1998	zima	250	/
P132	Planinska jama	21.01.1999	zima	226	/
P137	Planinska jama	14.04.1999	pomlad	222	/
P145	Planinska jama	18.10.1999	jesen	262	22,00
P147	Planinska jama	12.04.2000	pomlad	270	18,80
P149	Otoški breg	16.06.2000	poletje	248	27,34
P150	Otoški breg	27.10.2000	jesen	280	33,00
P151	Otoški breg	27.10.2000	jesen	240	15,50
P152	Kompoljska jama	30.01.2001	zima	260	16,90
P157	Otoški breg	15.11.2001	jesen	285	33,40
P163	Planinska jama	11.08.2003	poletje	246	20,37
P165	Planinska jama	21.08.2003	poletje	270	23,35
P168	Planinska jama	26.11.2003	jesen	257	21,69
P169	Planinska jama	26.11.2003	jesen	243	19,95
P171	Planinska jama	01.12.2004	zima	235	16,44
P176	Planinska jama	28.01.2005	zima	243	15,30
P177	Planinska jama	19.05.2005	pomlad	250	11,4
P181	Grčarske ravne	06.12.2005	zima	223	13,33
P182	Grčarske ravne	23.01.2006	zima	275	27,36
P187	Izvir Krupe	06.11.2006	jesen	180	9,05
P189	Izvir Krupe	12.07.2007	poletje	226	16,50
P192	Izvir Žibrščice pri Dobmiču	15.05.2009	pomlad	232	16,40
PE	ni poznana	14.05.1973	pomlad	/	/
PS1	ni poznana	25.02.1972	zima	/	/
PS2	ni poznana	27.05.1972	pomlad	/	/
PS3	ni poznana	10.10.1975	jesen	/	/
PS4	ni poznana	07.03.1975	pomlad	/	/
P4	ni poznana	/	/	208	/
P5	ni poznana	/	/	275	/
P6	ni poznana	/	/	260	/

3.2 METODE

3.2.1 Pregled ovarijev s stereolupo

Izolirane in fiksirane ovarije štirih osebkov (P140, P150, P165 in P192) smo pregledali pod stereolupo. Na osnovi morfologije in velikostnega razreda smo določili zoritvene faze oocit. Oocyte posameznih zoritvenih faz smo nato izolirali in vklopili v paraplant ter zoritveno fazo preverili še na histološkem nivoju. Velikost oocit smo izmerili z računalniškim programom Cell B, podatke pa smo obdelali v Excell-u. V ovarijih smo tudi prešteli oocyte IV. zoritvene faze.

3.2.2 Parafinske rezine

3.2.2.1 Fiksacija tkiva in priprava parafinskih rezin

Ovariji so bili fiksirani v različnih fiksativih (10% formalin, Bouin, Carnoy). Po fiksaciji smo tkiva ustrezno spirali in dehidrirali v rastoči alkoholni vrsti. Posamezne jajčne celice 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 paraplant, dve menjavi (prvič 4 ure, drugič 12 ur). Pri celotnih ovarijih je dehidracija v 70 % etanolu potekala dvakrat po 30 min, 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 paraplantu z dvema menjavama (prvič 4 ure, drugič 12 ur). Parafinske vzorce smo rezali na 5 - 12 μ m debele rezine z mikrotomom znamke Reichert Jung 2040.

3.2.2.2 Histološka barvanja in histokemijski testi v parafinskih rezinah

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 treba iz rezin odstraniti hidrofojni parafin in jih ponovno hidrirati. Pred barvanjem smo iz rezin s ksilenom najprej odstranili parafin (2 krat po 3 min), rezine smo 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. Barvanju je sledilo spiranje z destilirano vodo in hidracija v 70 % in 96 % etanolu (v vsakem 2 krat po nekaj sekund). Preparate smo prenesli v propanol (2 krat po nekaj sekund) in jih zbistrili v ksilenu (2 krat nekaj sekund ali dlje). Na koncu smo na vsako stekelce kapnili Pertex in ga prekrili s krovnim stekelcem.

3.2.2.2.1 Barvanje Hematoksilin – Eozin

Zelo razširjena tehnika splošnega histološkega barvanja je barvanje tkiv s hematoksilinom in eozinom. Hematoksilin je bazično barvilo in obarva jedra modro vijolično, eozin pa je kislo barvilo in obarva citoplazmo roza do rdečkasto. To je preprosta metoda, s katero ne moremo določiti kemijske sestave celic (Kiernan, 1990).

Hidrirane preparate smo prenesli v Weigertov železov hematoksilin (3 min) in jih sprali v tekoči vodi. Jedra smo 2 min diferencirali s solno kislim alkoholom (70 % etanol in koncentrirana HCl) in jih sprali z destilirano vodo. Sledilo je barvanje z eozinom (3 min), dehidracija, bistrenje in prekrivanje.

3.2.2.2.2 Barvanje Masson - Fontana

Osnova metode Masson - Fontana je značilnost nekaterih fenolnih substanc in derivatov tirozina, da reducirajo srebrove raztopine v kovinsko srebro. Takšno lastnost ima tudi melanin, kar je osnova identifikacije po tej metodi. Zaradi redukcije se na melaninskih granulah nalaga kovinsko srebro, zaradi česar se le-te obarvajo močno črno. Jedra se z barvilom safranin obarvajo rdeče do roza.

Fontana raztopino smo pripravili po sledečem postopku: 20 ml 10 % raztopine srebrovega nitrata dodajamo po kapljicah koncentrirano raztopino amonijaka, dokler se raztopina ne zbistri; nato dodamo 20 ml destilirane vode in pustimo stati preko noči. Naslednji dan smo hidrirane parafinske rezine obdelovali 10 min v lugolni raztopini (gram iodin) in jih nato spirali pod tekočo vodo. Sledilo je razbarvanje v 5 % natrijevem tiosulfatu (2 min). Po nekaj minutah spiranja pod tekočo vodo smo rezine čez noč pustili v temnem prostoru, potopljene v prefiltrirani Fontana raztopini. Naslednji dan smo vzorce dobro sprali z destilirano vodo, jih 3 min tretirali s 0,2 % AuCl in jih ponovno sprali z destilirano vodo. Sledila je titracija z 5 % natrijevim tiosulfatom (2 min), spiranje pod tekočo vodo (5 min) ter kontrastiranje z 0,1 % safraninom (5 min). Rezine smo nato po klasični metodi dehidrirali, zbistrili v ksilenu in prekrili.

Kot negativno kontrolo smo uporabili tkiva, ki smo jih predhodno 24 ur obdelovali z 10 % vodikovim peroksidom. Reakcija Masson - Fontana je na tako obdelanem vzorcu negativna.

3.2.2.2.3 Barvanje Alizarin red, Heidenhain ter Macfarlane

Preparati, obarvani z barvili Alizarin red, Heidenhain ter Macfarlane, so bili vzeti iz zbirke skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev. Barvanje Alizarin red je specializirano za ugotavljanje prisotnosti kalcija, barvanje Heidenhain pa za prikaz jedrnih struktur med celičnimi delitvami (Presnell in Schreibman, 1997).

3.2.3 Poltanke in ultratanke rezine

3.2.3.1 Fiksacija tkiva in priprava poltankih in ultratankih rezin

Koščke tkiva smo fiksirali 3 ure v fiksativu Karnovsky z osmolarnostjo 307 mOsm/kg. Karnovsky je mešanica 0,5 % paraformaldehida in 1,15 % glutaraldehida v 0,05 M kakodilatnem pufru (pH 7,4). Tkivo smo izpirali v izpiralni tekočini (0,05 M kakodolatni pufer in 0,25 M saharoza) z osmolarnostjo 307 mOsm/kg (dve menjavi: preko noči in še čez 2 uri). Sledila je postfiksacija v 2 % OsO_4 s fericianidom (2h in 30 min v temi, na sobni temperaturi). Tkivo smo nato izpirali v destilirani vodi (3 menjave po 10 min). Nato smo tkivo dehidrirali v 50 %, 70 %, 90 % in absolutnem alkoholu (v vsakem 2 menjavi po 15 min, v absolutnem alkoholu pa še dodatno 30 min). Sledilo je vklapljanje v vklopni medij Spurr (ERL), najprej v mešanici absolutnega alkohola in ERL (1:1) dvakrat po 15 min, nato v samem ERL (tri menjave: eno uro, nato preko noči in ponovno eno uro). Polimerilizirali smo v sveže pripravljenem ERL pri 70° C (preko noči).

Poltanke rezine debeline 0,5 μm smo rezali s steklenimi noži na ultramikrotomu Reichert Ultracut S. Rezine smo polagali na kapljico destilirane vode na objektnem stekelcu ter jih raztezali na termoplošči pri temperaturi 96° C. Po 10 minutnem sušenju na termoplošči smo rezine barvali z barvilom Azur II Methylene blue in objektno stekelce 15 sekund segrevali nad plamenom špiritnega gorilnika. Nato smo barvilo sprali z destilirano MiliQ vodo in preparat ponovno postavili na termoploščo, dokler se ni posušil.

Ultratanke rezine smo rezali z diamantnim nožem Diatome ultra na ultramikrotomu Reichert Ultracut S. Rezine smo prenesli na bakrene mrežice (nosilce preparata). Ultratanke rezine smo kontrastirali z uranil acetatom (15 min) in svinčevim citratom (10 min) po postopkih Venable in Coggeshall (Bozzola in Russel, 1991).

3.2.4 Mikroskopiranje

Anatomske preparate smo pregledovali s stereolupo *Leica MZFLIII*, in poslikali s fotoaparatom *NIKON E4500* ter s stereolupo z živim zajemom slike *Olympus SZX2-ILLT*. Histološke preparate in poltanke rezine smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom *OPTON-Axioskop Zeiss* in jih fotografirali z digitalnim fotoaparatom *Canon DS 6041*.

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

Fotografije parafinskih, poltankih rezin in posnetke presevnega elektronskega mikroskopa smo opremili z računalniškim programom *Adobe Photoshop CS 2*. S programom *Excell* smo izračunali povprečne velikosti oocit, standardne odklone za vsako zoritveno fazo ter analizo variance med dolžino in maso telesa ter zrelostjo ovarija. Z *Excell-om* smo oblikovali vse preglednice in grafe, ki so vključeni v diplomsko nalogo.

4 REZULTATI

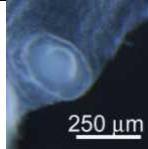
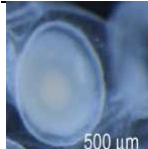
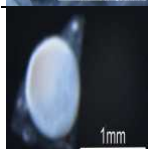
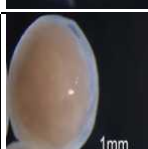
4.1 REPRODUKTIVNI CIKEL

4.1.1 Faze zoritve jajčnih celic

S stereolupo smo v ovarijih dveh poleti žrtvovanih osebkov (P149 in P165) in jeseni žrtvovanega osebkov (P150), upoštevaje morfološke značilnosti in velikost oocit, določili zoritvene faze oocit. Posamezne zoritvene faze smo izolirali, jih vklopili v paraplast in preverili njihove značilnosti še na histološkem nivoju. Izmerili smo velikosti oocit in izračunali povprečno velikost ter standardni odklon za vsako zoritveno fazo (pregl. 2). V ovarijih omenjenih osebkov smo prešteli oocyte najbolj zrele zoritvene faze.

Oocyte I. zoritvene faze so prosojne z mlečno belim ali prosojnim jedrom. Premer oocit je od 100 do 360 μm . Oocyte II. zoritvene faze so manj prosojne, jedro je še opazno. Izmerjene velikosti so od 310 do 630 μm . V oocitah III. zoritvene faze jedro ni vidno, oocyte so bele in premera od 560 do 1050 μm . Za oocyte IV. zoritvene je značilna enakomerna rjava pigmentiranost. Velike so od 950 do 1800 μm . IV. zoritvena faza je tudi najbolj zrela faza pregledanih ovarijev ($N = 3$). Našteli smo od 32 do 55 oocit na ovarij.

Preglednica 2. Morfološki izgled in velikosti oocit posameznih zoritvenih faz.

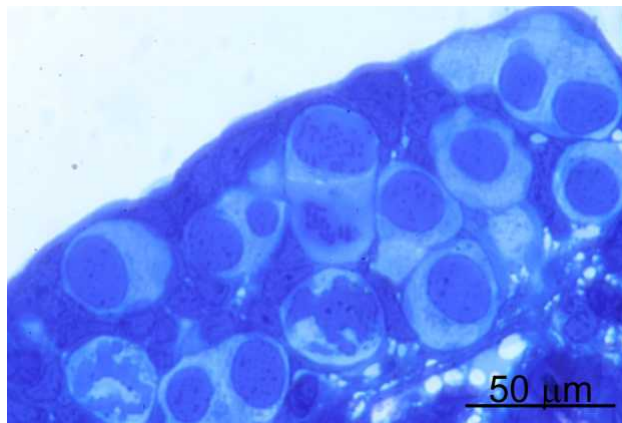
	ZORITVENA FAZA	OSEBEK	VELIKOSTI OOCIT (μm)		POVPREČNA VELIKOST (μm)	STANDARDNI ODKLON (μm)	ŠT. VZORCEV
			min	max			
	OI	P149	100	360	198	59	29
		P150	130	340	208	56	33
		P165	100	300	207	69	22
		SKUPNO OI	100	360	205	60	84
	OII	P149	360	630	491	77	27
		P150	330	620	448	95	21
		P165	310	620	442	85	20
		SKUPNO OII	310	630	463	87	68
	OIII	P149	560	1050	759	124	27
		P150	560	950	732	92	26
		P165	580	1030	771	120	27
		SKUPNO OIII	560	1050	754	113	80
	OIV	P149	1100	1480	1300	110	27
		P150	950	1800	1211	221	18
		P165	1130	1720	1484	139	21
		SKUPNO OIV	950	1800	1332	189	66

Legenda: OI do OIV – zoritvene faze oocit.

Velikosti oogonijev pod stereolupo nismo določali, saj so bile povečave premajhne. Izmerili smo jih na histoloških rezinah izoliranih in vklopljenih koščkov ovarija vseh treh osebkov (P149, P150, P165).

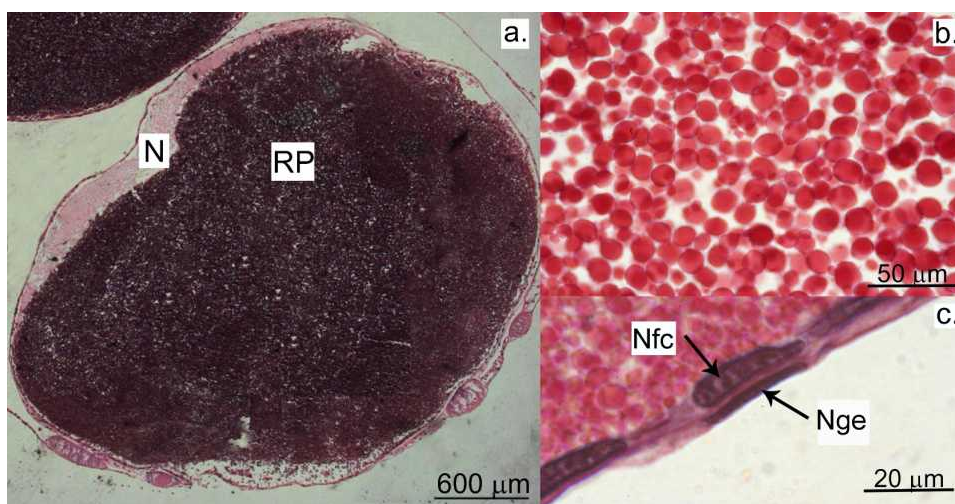
Oogoniji so okrogle ali jajčaste oblike, pod stereolupo so prosojni. Izmerjena velikost je od 13 do 82 μm, Kar 95 % oogonijev, ki smo jih zajeli v vzorec, se nahaja v velikostnem razredu od 20 do 50 μm.

V steni ovarija so oogoniji posamično ali pa v skupkih ali gnezdih (sl. 2). Gnezda oogonijev se pojavljajo ob oocitah zrelejših zoritvenih faz. Število oogonijev v skupku je različno, od nekaj do preko dvajset. Upošteva se lego njihovega jedra oogoniji v gnezdih niso orientirani v isti smeri.



Slika 2. Gnezdo oogonijev v steni ovarija. Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue.

Pri pregledu preparatov iz stare histološke zbirke smo v ovarijih dveh osebkov (P7 in P47) našli oocyte velikosti od 2090 do 3380 μm . Glede na velikost in ostale značilnosti sodijo v V. zoritveno fazo. Citoplazmo oocyte popolnoma zapolnjujejo rumenjake ploščice (sl. 3a). Jedro je stisnjeno ob oolemo. Lipidnih kapelj med rumenjakovimi ploščicami ni opaziti, saj se pri fiksaciji tkiva niso ohranile (sl.3b). Oocito obdajajo vitelinska ovojnica, ploščate celice folikularnega epitela, ožiljen sloj vezivne teke ter ploščate celice zunanega epitela (sl. 3c).



Slika 3 a - c. Oocita V. zoritvene faze premera 3380 μm . **a.** Citoplazmo zapolnjujejo rumenjake ploščice. (RP). Jedro (N) je stisnjeno ob oolemo. **b.** Rumenjake ploščice pod večjo povečavo. Lipidnih kapelj ni videti, saj se pri pripravi tkiva niso ohranile. **c.** Oocito obdajajo sploščene celice folikularnega epitela, tanek sloj vezivne teke ter sploščene celice zunanega epitela. Nfc – jedro celic folikularnega epitela. Nge – jedro celic zunanega epitela. **a - c.** Parafinske rezine. **a.** Barvanje Hematoksilin - Eozin. **b - c.** Barvanje Alizarin red.

4.1.2 Zrelost ovarija in letni čas

Zrelost ovarija smo določili z najbolj zrelo zoritveno fazo oocit v ovariju. Zanimala nas je korelacija med zrelostjo ovarija in letnim časom. V raziskavo smo vključili 30 osebkov, ki so bili žrtvovani v različnih mesecih leta (pregl. 3). 10 osebkov (P132, P151, P152, P169, P171, P181, P187, P4 do P6) je bilo vključenih že v diplomsko nalogo Ive Talaber (2008), z 19 osebki pa analizo dopolnjujemo. V vzorec so zajeti vsi meseci, razen septembra. Število osebkov v vzorcu za posamezen mesec variira od enega do pet osebkov.

V ovarijih vseh osebkov so vedno prisotni oogoniji ter previtelogene oocyte I. in II. zoritvene faze. Šest osebkov od tridesetih ni imelo vitelogenih oocit, najbolj zrela faza v ovariju so bile oocyte II. zoritvene faze (pregl. 3). Večina teh osebkov je bila žrtvovana v novembru in decembru. Ostali osebki so imeli v ovariju tudi že vitelogene oocyte. Devet osebkov je imelo oocyte III. zoritvene faze kot najbolj zrelo fazo zoritve, trinajst osebkov IV. fazo zoritve in dva osebka V. fazo zoritve (pregl. 3). Vitelogene oocyte III. in IV. zoritvene faze se v ovarijih pojavljajo preko celega leta, torej v vseh mesecih leta. Oocyte V. zoritvene faze smo našli le v ovarijih osebkov, žrtvovanih oktobra in februarja.

Preglednica 3. Zrelost ovarijev močerila (*Proteus anguinus anguinus*) skozi leto. Zrelost smo določili z najbolj zrelo zoritveno fazo oocit v ovariju. Vzorec vključuje 30 osebkov.

Oznaka osebka	Datum fiksacije	Letni čas fiksacije	Dolžina telesa (mm)	Masa osebka (g)	Zrelost ovarija			
					OII	OIII	OIV	OV
P171	1.12.2004	zima	235	16,44		+		
P181	6.12.2005	zima	223	13,33	+			
P131	15.12.1998	zima	250				+	
P132	21.1.1999	zima	226				+	
P182	23.1.2006	zima	275	27,36		+		
P176 *	28.1.2005	zima	243	15,3		+		
P152	30.1.2001	zima	260	16,9		+		
P047	4.2.1981	zima	250					+
PS1	25.2.1972	zima				+		
PS4	7.3.1975	pomlad					+	
P147*	12.4.2000	pomlad	270	18,8			+	
P137	14.4.1999	pomlad	222				+	
PE	14.5.1973	pomlad					+	
P192	15.5.2009	pomlad	232	16,6		+		
P177*	19.5.2005	pomlad	250	11,4	+			
P090	25.5.1984	pomlad	235				+	
PS2	27.5.1972	pomlad				+		
P149	16.6.2000	poletje	248	27,34			+	
P189	12.7.2007	poletje	226	16,5		+		
P163	11.8.2003	poletje	246	20,37		+		
P165	21.8.2003	poletje	270	23,35			+	
P007	7.10.1977	jesen	240					+
PS3	10.10.1975	jesen					+	
P145	18.10.1999	jesen	262	22			+	
P150	27.10.2000	jesen	280	33			+	
P151	27.10.2000	jesen	240	15,5	+			
P187	6.11.2006	jesen	180	9,05	+			
P157	15.11.2001	jesen	285	33,4			+	
P168	26.11.2003	jesen	257	21,69	+			
P169	26.11.2003	jesen	243	19,95	+			

Legenda: * osebk (P147, P176 in P177) niso bili hranjeni 14 do 18 mesecev. OII do OV – zoritvene faze oocit.

V vzorcu smo imeli tudi ovarije treh osebkov, ki se niso prehranjevali od 14 do 18 mesecev. V ovariju so imeli različno zrele faze oocit, bodisi oocyte II. faze zoritve, III. ali pa IV. faze zoritve. Osebek, žrtvovan v januarju, je imel v ovariju najbolj zrelo oocito III. zoritvene faze, osebk, žrtvovana v aprilu in maju, pa IV. oz. II. zoritveno fazo (pregl. 3).

V jamskem laboratoriju v Moulisu močerili odlagajo jajca preko celega leta, z večjo preferenco odlaganja med oktobrom in marcem (Juberthie in sod., 1994). Zato smo primerjali zrelost ovarijev osebkov, ki so bili žrtvovani v obdobju večje preference odlaganja jajc, tj. od oktobra do marca ($N = 19$) z zrelostjo ovarijev osebkov, žrtvovanih izven tega obdobja, tj. od aprila do avgusta ($N = 11$). Preko celega leta so v ovarijih oocyte bodisi II., III. ali pa IV. zoritvene faze. Oocyte V. zoritvene faze pa smo zasledili le v ovarijih dveh osebkov, žrtvovanih med oktobrom in marcem.

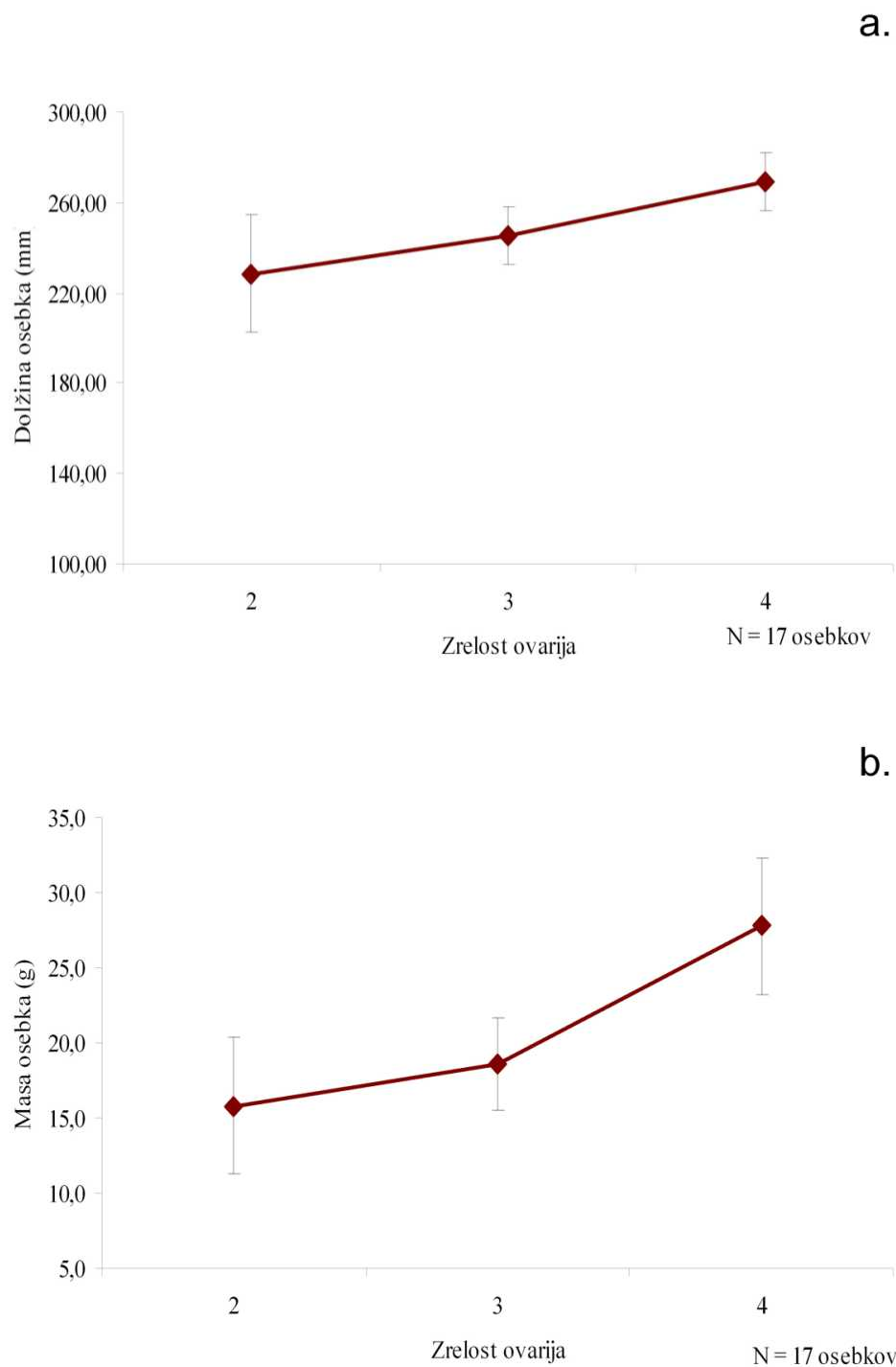
4.1.3 Povezanost dolžine in mase telesa z zrelostjo ovarija

Zanimala nas je povezanost med dolžino in maso telesa močerila ter zrelostjo ovarija. Zrelost ovarija smo določili z najbolj zrelo oocito v ovariju. V vzorec za statistično analizo so zajeti osebki s popolnimi podatki. Iz vzorca smo izločili osebk, ki so stradali. Razpon dolžine telesa osebkov je od 180 mm do 285 mm, razpon mase telesa pa od 9,05 g do 33,4 g (pregl. 3). Izračunali smo varianco in naredili korelacijski graf med dolžino in maso ter zrelostjo ovarija.

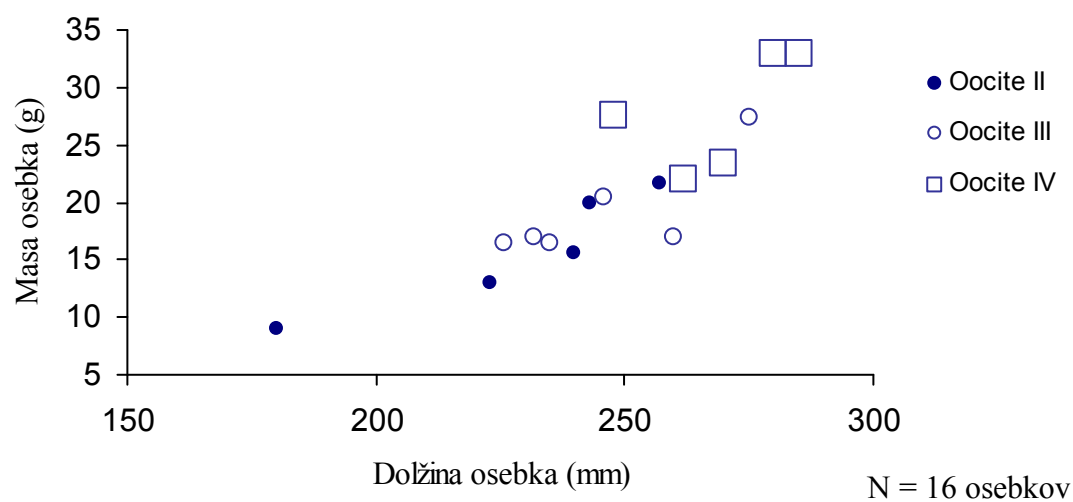
Izkazalo se je, da je dolžina telesa statistično značilno povezana z zrelostjo ovarija ($p = 0.028 < 0.05$). Osebki z zrelejšimi ovariji so daljši (sl. 4a, 5).

Prav tako je masa osebkov statistično značilno povezana z zrelostjo ovarijev ($p = 0.003 < 0.01$). Osebki z zrelejšimi ovariji so masivnejši (sl. 4b, 5).

Pri zrelosti ovarija moramo upoštevati oba parametra telesa (dolžino in maso telesa), saj sta med seboj povezana.



Slika 4 a-b. Povezanost med dolžino telesa in zrelostjo ovarija (a.) ter maso telesa in zrelostjo ovarija (b.). Povezanost je prikazana z 95% intervali zaupanja. V vzorec je bilo vključenih 17 osebkov. Z 2 - 4 so označene zrelostne faze oocit.

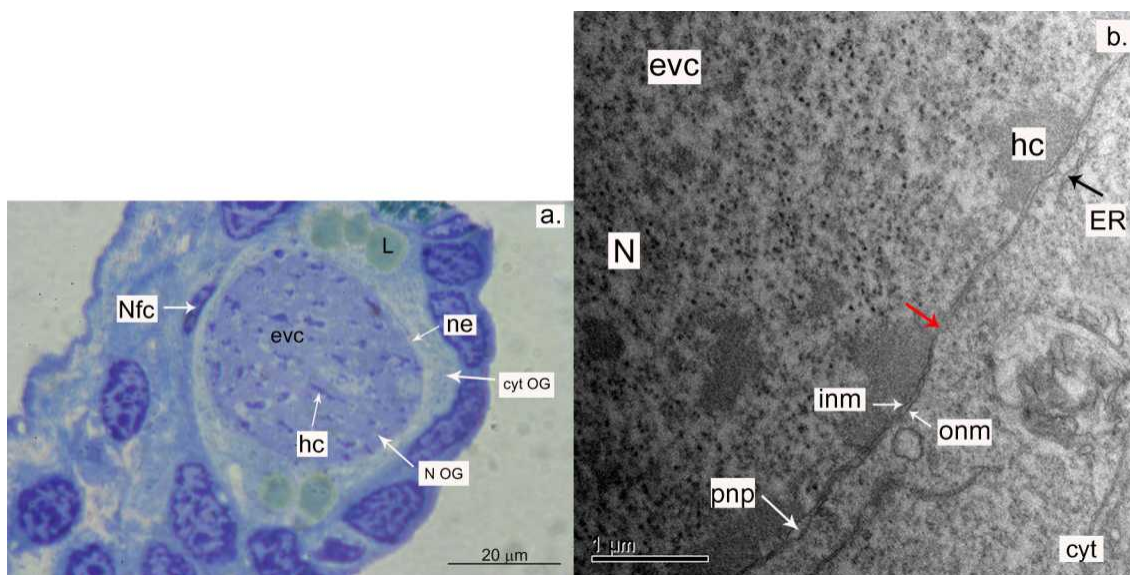


Slika 5. Povezanost dolžine ter mase telesa z zrelostjo ovarija. V vzorec je vključenih 16 osebkov. Zrelost ovarija smo določili z najbolj zrelo zoritveno fazo oocit v ovariju. V ovarijih daljših in masivnejših osebkov so oocite zrelejših zoritvenih faz (III. in IV. zoritvena faza).

4.2 SPREMEMBE JEDRNIH STRUKTUR MED OOGENEZO

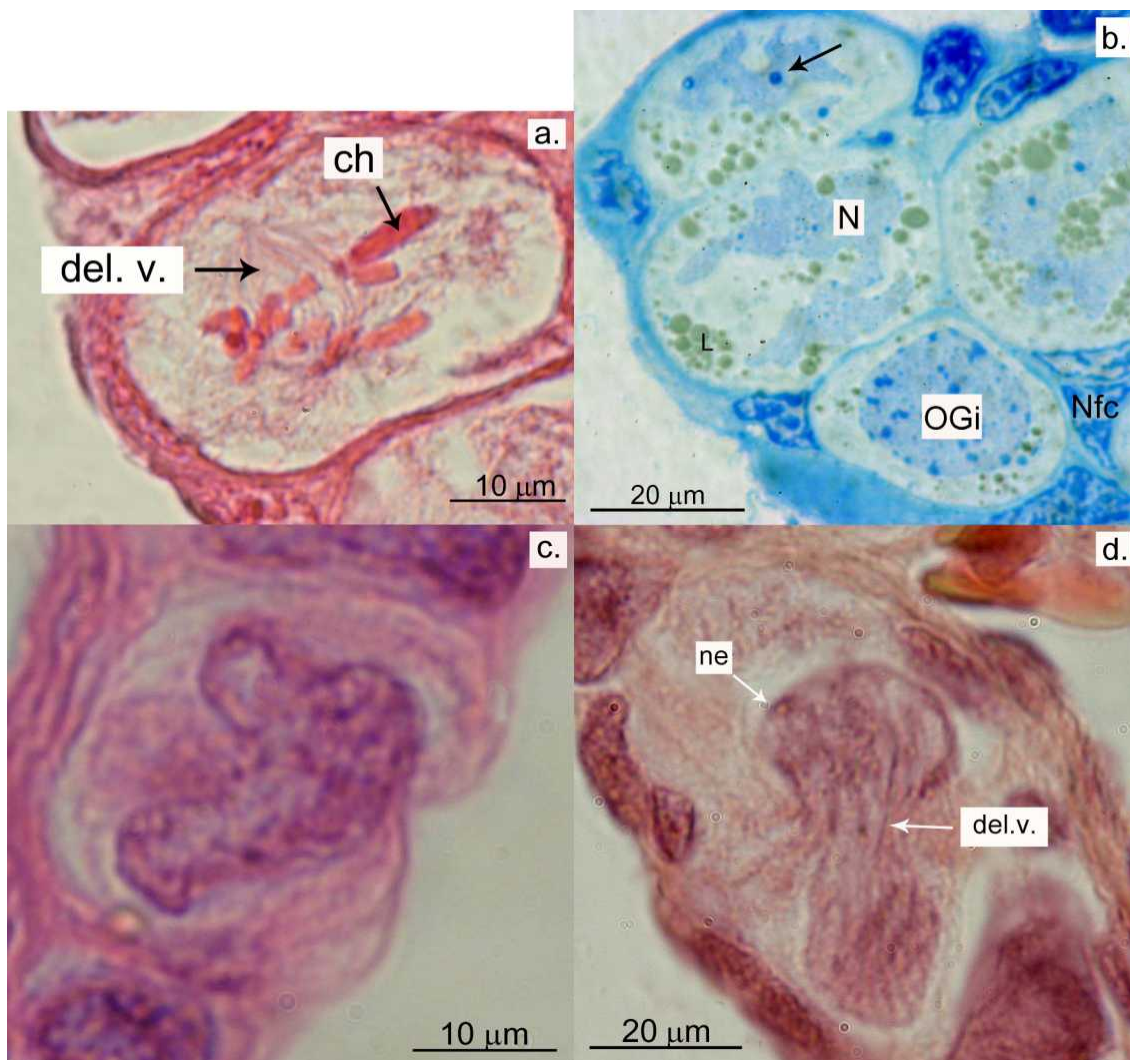
4.2.1 Jedro oogonija

Oogonij ima v interfazi mitotske delitve ovalno jedro, ki zavzema velik del volumna celice (sl. 6a). V njem prevladujejo območja evkromatina, naključno pa se ob notranji membrani jedrne ovojnice ter v nukleoplazmi pojavljajo otočki heterokromatina (sl. 6a in b). Jedra so maloštevilna in v jedru interfaznih oogonijev težje prepoznavna od skupkov heterokromatina.



Slika 6 a - b. Jedro oogonija. **a.** Oogonij v steni ovarija. **b.** Struktura jedra oogonija (N). Jedrna ovojnica je iz notranje (inm) in zunanje membrane (onm), z vmesnim perinuklearnim prostorom (pnp). cyt in cyt OG – citoplazma oogonija. ER – endoplazemski retikulum. evc – evkromatin. hc - heterokromatin. L – lipidne kapljice. m – mitohondrij. N OG – jedro oogonija. ne – jedrna ovojnica. Nfc – jedro prefolikularne celice. **a.** Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene blue. **b.** TEM posnetek.

Pogoste so mitotske delitve oogonijev, ki so v skupkih ali gnezdih. V metafazi mitotske delitve so kromosomi razporejeni v ekvatorialnem delu celice (sl. 7a). Jedrnega ovoja ni. V telofazi se v oogonijih ponovno oblikuje jedrni ovoj. Jedro ima nepravilno, režnjasto obliko z razločno vidnimi od 1 do 4 jedrci (sl. 7b in c).

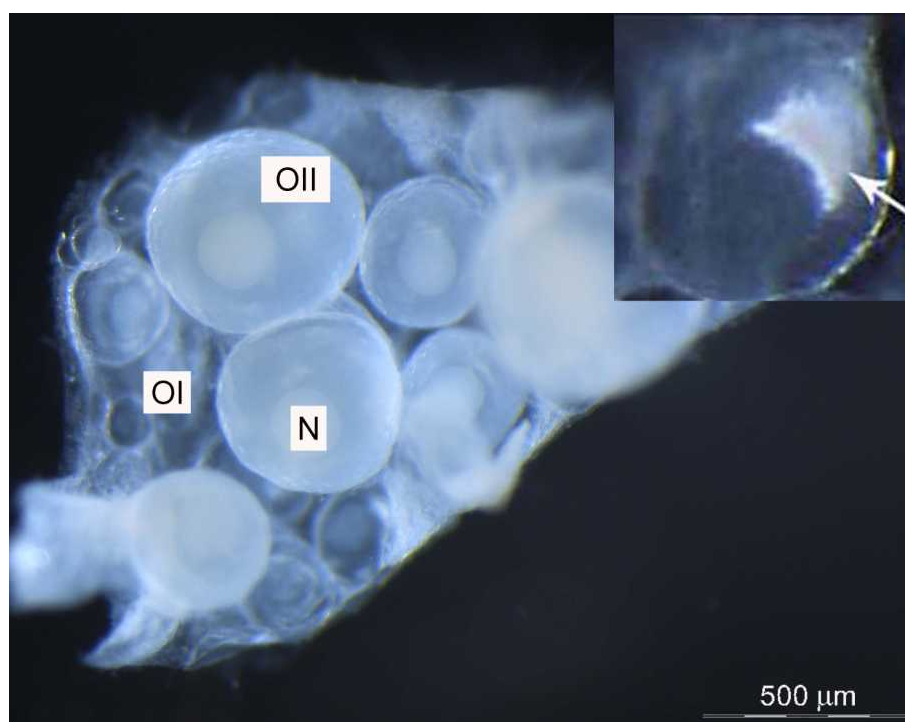


Slika 7 a - d. Oogoniji v procesu mitotske delitve. **a.** Oogonij v metafazi. Kromosomi (ch) so v ekvatorialnem delu celice, jedrega ovoja ni. **b in d.** Oogonij v telofazi. Jedro ima nepravilno, režnjasto obliko ter maloštevilna jedrca (črna puščica). del.v. – delitveno vreteno. L – lipidne kapljice. N – jedro oogonija. ne – jedrna ovojnica. Nfc – jedro prefolikularne celice. OGi – oogonij v interfazi. **a.** Parafinska rezina. Barvanje Masson - Fontana. **b.** Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene blue. **c - d.** Parafinski rezini. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

4.2.2 Jedro oocite I. zoritvene faze

Po vstopu oogonijev v mejotsko delitev je na nivoju svetlobne mikroskopije težko razločiti med fazami profaze I. mejotske delitve, zato bomo spremembe v jedru opisali po posameznih zoritvenih fazah oocit.

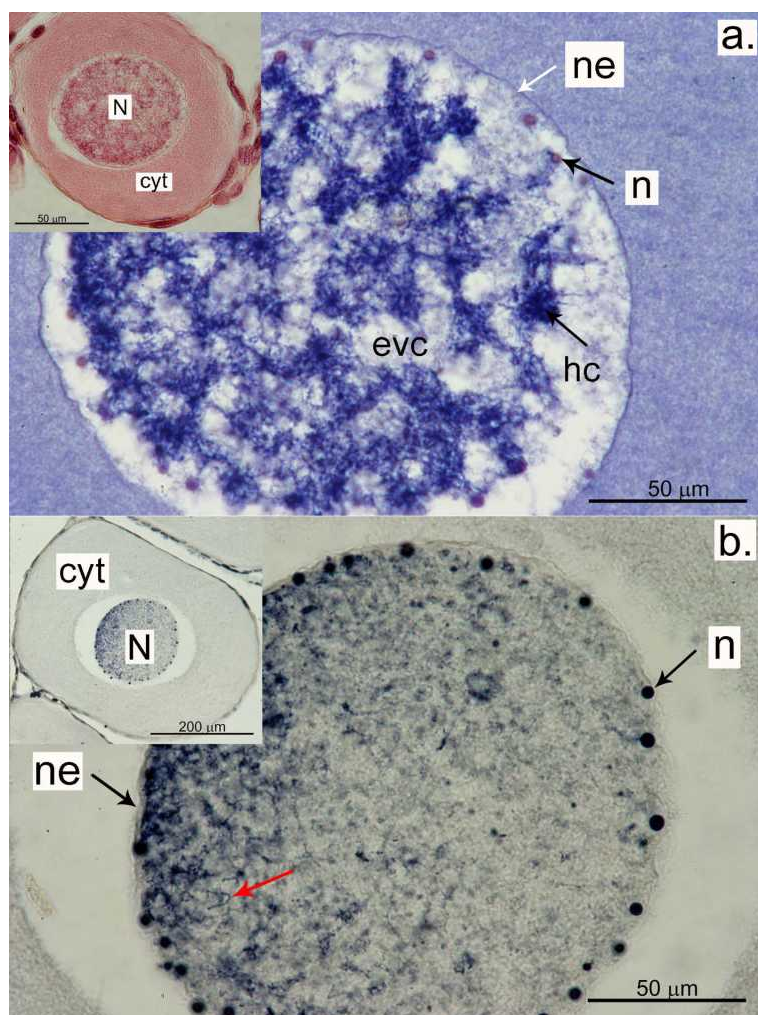
V središču oocite I. zoritvene faze je veliko, okroglo jedro (sl. 8, izsek, 9a, izsek). Na obodu jedra je gostejša, neprosojna masa (sl. 8, izsek). Zaradi izmenjujočih območij temnejšega heterokromatina in svetlejšega evkromatina je jedro videti vakuolizirano (sl. 9a). Jedrna ovojnica je gladka. Lahko je rahlo nagubana, pod njo so majhna jedrca. Na obodu prečnega prereza jedra je približno 10 do 30 jedrc.



Slika 8. Oocyte I. in II. zoritvene faze (OI in OII). N – jedro. Izsek. Oocita I. zoritvene faze pod večjo povečavo. Gostejša, neprosojna masa (bela puščica) tik ob jedru oocite I. zoritvene faze poudari obod prozornega jedra. Stereolupa.

4.2.3 Jedro oocite II. zoritvene faze

V II. zoritveni fazi je okroglo jedro še vedno v centralnem delu oocite (sl. 9b, izsek). Na anatomskem nivoju je jedro gostejše in bolj mlečno belo od citoplazme (sl. 8). V histoloških rezinah je kromatin videti zelo zgoščen, tako da lahko v jedru razločimo posamezne kromatinske niti (sl. 9b). Jedrna ovojnica je malo bolj nagubana kot v predhodni fazi. Poveča se tudi število jedrc na obodu prečnega prereza jedra. Prešteli smo od 15 do 40 jedrc.

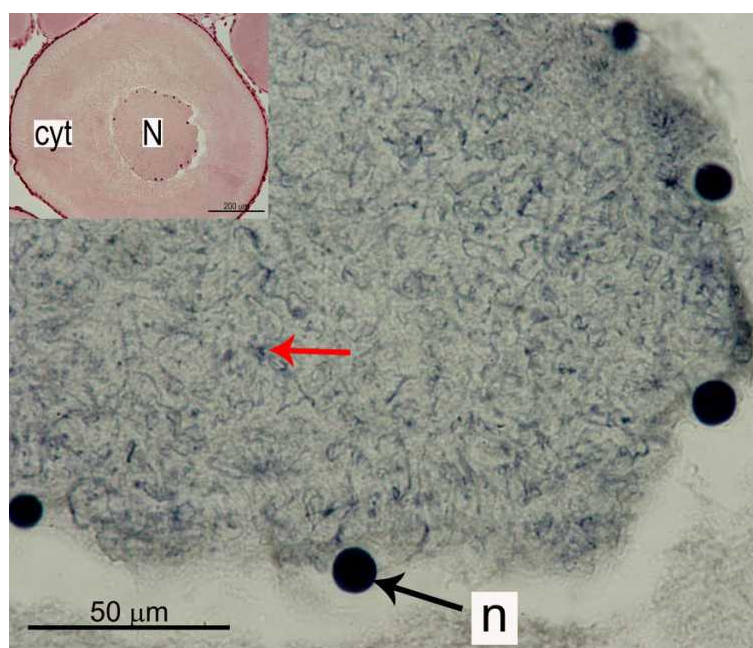


Slika 9 a - b. Struktura jedra v oociti I. (sl. a) in II. (sl. b) zoritvene faze ter njuna centralna lega v oociti (izseka). **b.** V jedru oocite II. zoritvene faze so vidne posamezne kromatinske niti (rdeča puščica). cyt – citoplazma. evc – evkromatin. hc – heterokromatin. N – jedro. n – jedrce. ne – jedrna ovojnica. **a - b.** Parafinske rezine. **a.** Barvanje Alizarin red oz. Hematoksilin – Eozin (izsek). **b.** Barvanje Mallory - Heidenhain.

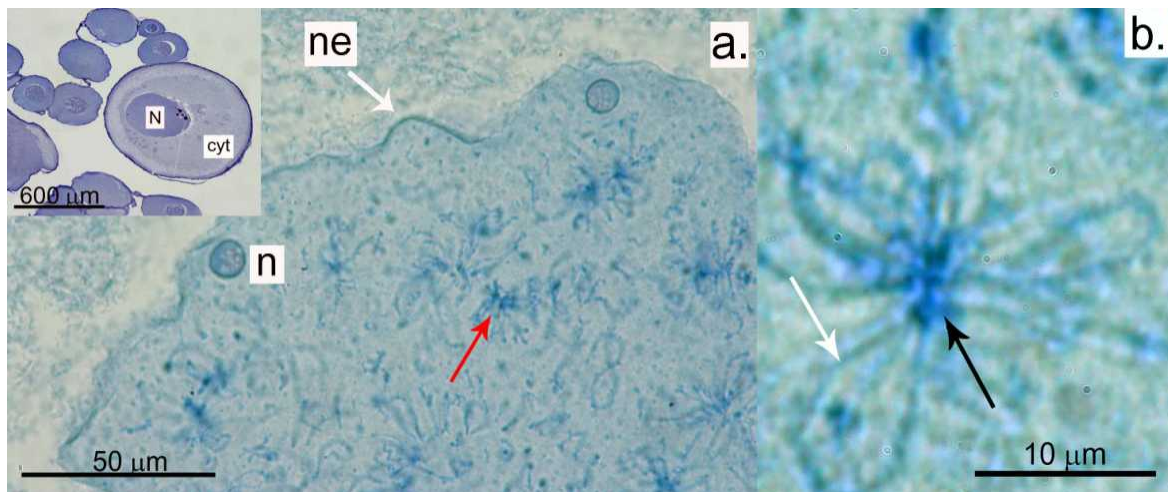
4.2.4 Jedro oocyte III. in IV. zoritvene faze

Oocita III. zoritvene faze je na anatomskem nivoju neprosojna, zato jedro ni vidno. Ovalno jedro leži v centralnem delu oocyte. Jedrna membrana je režnjasta (sl. 10, izsek). Vidni so veliki krtačasti kromosomi. Jedra tik pod jedrno ovojnico so večja, vendar jih je manj kot v predhodni fazi. Na obodu jedra je 5 do 15 jedrc (sl. 10).

V IV. zoritveni fazi je jedro zelo podobno III. zoritveni fazi, le da je njegova ovalna oblika še bolj očitna (sl. 11a, izsek). Jedro pozne IV. zoritvene faze leži izven centralne lege. Oblika krtačastih kromosomov je zelo izrazita, sestavljeni so iz kromosomske osi in lateralnih zank (sl. 11b).



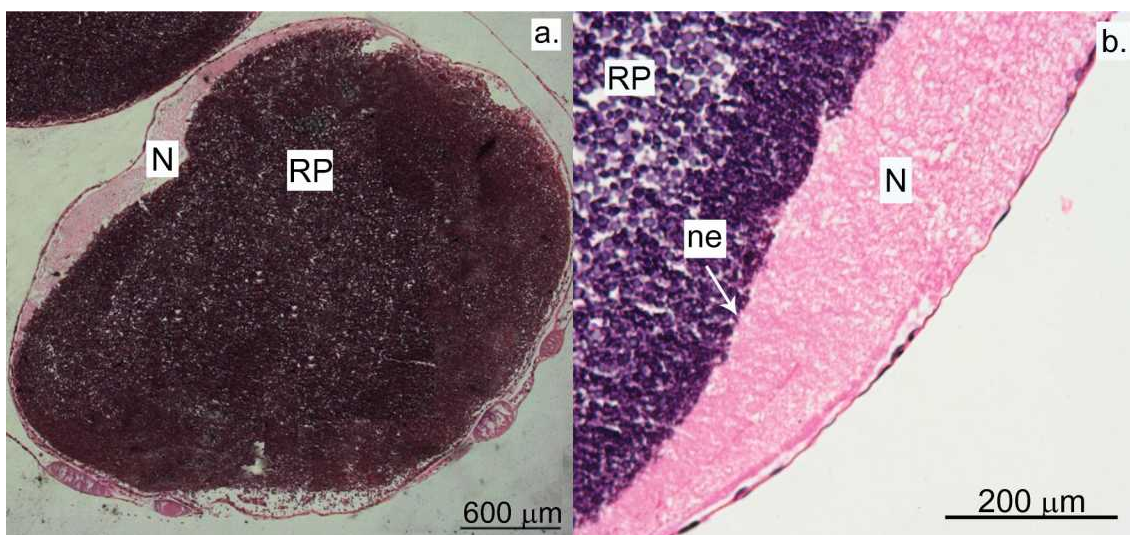
Slika 10. Struktura jedra oocyte III. zoritvene faze in njegova centralna lega v oociti (izsek). Vidne so zgodnje oblike krtačastih kromosomov (rdeča puščica). cyt – citoplazma. N – jedro. n – jedrce. Parafinska rezina. Barvanje Mallory - Heidenhain oz. Hematoksilin – Eozin (izsek).



Slika 11 a - b. Struktura jedra oocite IV. zoritvene faze. **a.** Jedro s krtačastimi kromosomi (rdeča puščica). **Izsek.** Lega jedra izven centra. **b.** Krtačast kromosom pod večjo povečavo. Vidna je kromosomska navidezna os (črna puščica) ter lateralne zanke (bela puščica). cyt – citoplazma. N – jedro. n – jedrce. ne – jedrna ovojnica. Parafinske rezine. **a - b.** Barvanje Macfarlane oz. Alizarin red (izsek na sl. a).

4.2.5 Jedro oocite V. zoritvene faze

V oociti V. zoritvene faze je zaradi zapolnjenosti citoplazme z rumenjakovimi ploščicami jedro stisnjeno ob plazmalemo (sl. 12). Jedro je svetlo, evkromatsko. Ima podolgovato obliko, ki je na koncih zožena ter ukrivljena.



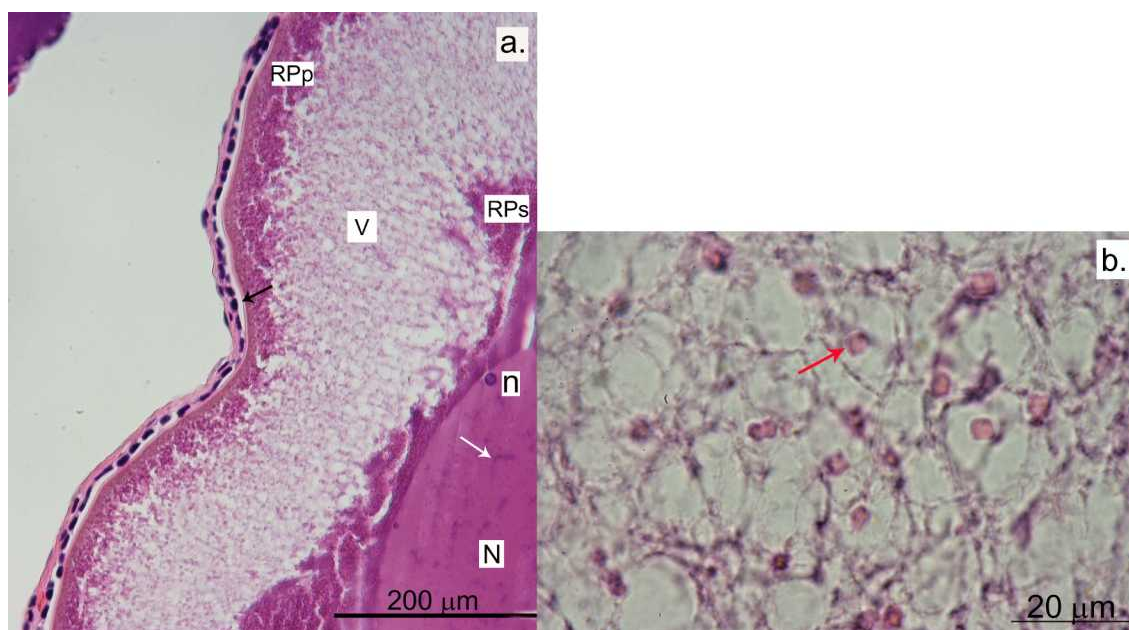
Slika 12 a - b. Ob plazmalemi ležeče jedro (N) oocite V. zoritvene faze. **b.** Jedro pod večjo povečavo. ne – jedrna ovojnica. RP – rumenjakove ploščice. **a - b.** Parafinska rezina. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

4.3 SPREMEMBE CITOPLAZEMSKIH STRUKTUR MED OOGENEZO

4.3.1 Rumenjakove ploščice

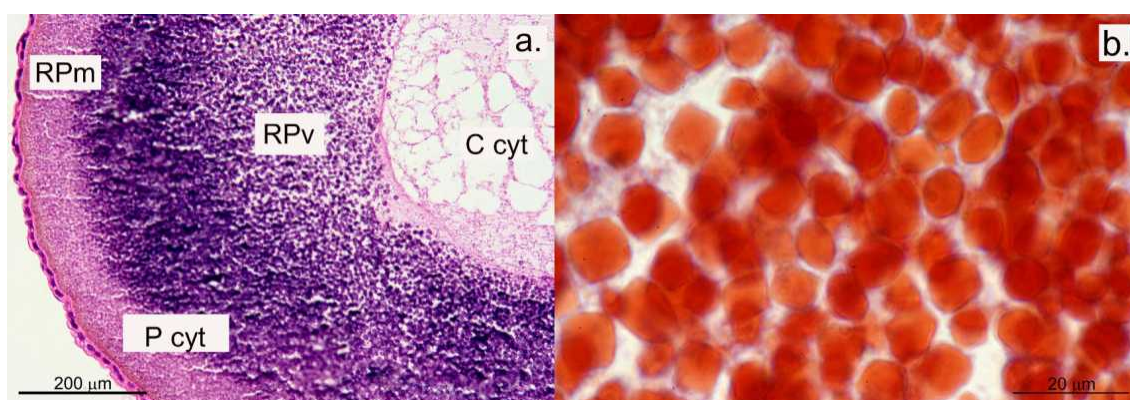
4.3.1.1 Rumenjakove ploščice v oociti IV. zoritvene faze

Rumenjakove ploščice se prvič pojavijo v citoplazmi oocite zgodnje IV. zoritvene faze, ko je premer oocite približno 1100 μm . Kopičijo se v ozkem robnem pasu med oolemo in vakuolizirano osrednjo citoplazmo ter v citoplazmi tik ob jedru (sl. 13). V osrednji citoplazmi so rumenjakove ploščice manj številne in razpršene (sl. 13b). Osrednja citoplazma je vakuolizirana, ker se lipidi v procesu fiksacije niso ohranili.



Slika 13 a - b. Razporeditev rumenjakovih ploščic v vitelogeni oociti zgodnje IV. zoritvene faze. **a.** Koncentracija rumenjakovih ploščic je največja v citoplazmi tik ob jedru (RPs) in v ozkem robnem pasu (RPp) med oolemo ter vakuoliziranim slojem citoplazme (V). V jedru (N) so vidni krtačasti kromosomi (bela puščica) ter jedrca (n). Pod slojem kubičnih folikularnih celic je vidna vitelinska ovojnica (črna puščica), ki pa je zaradi slabe fiksacije odstopila. **b.** Rumenjakove ploščice (rdeča puščica) v osrednjem vakuoliziranem sloju citoplazme. **a – b.** Parafinski rezini. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

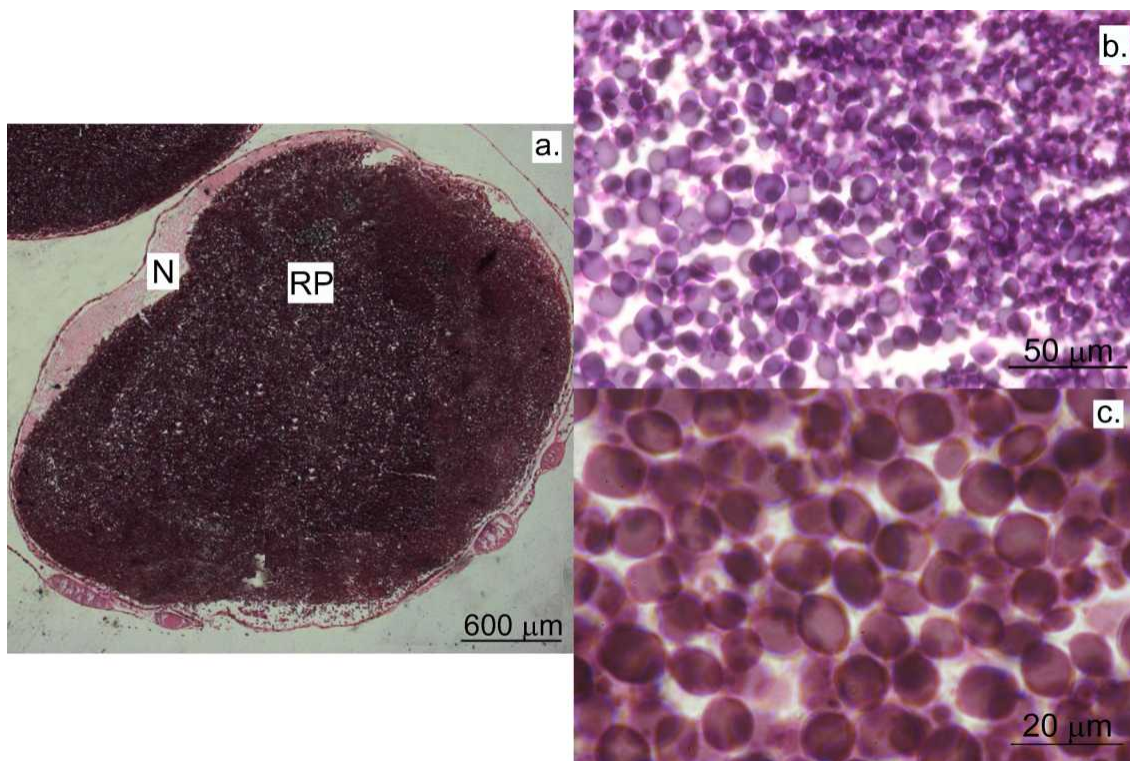
V vitelogeni oociti pozne IV. zoritvene faze, ko je premer oocite približno 1500 μm , se robni sloj rumenjakovih ploščic razširi in plastovito uredi (sl. 14a). Tik pod oolemo so rumenjakove ploščice manjše in svetleje obarvane, nad njimi je debel sloj večjih in temneje obarvanih rumenjakovih ploščic, s premerom 10 μm . Rumenjakove ploščice imajo homogen videz (sl. 14b). V osrednji citoplazmi rumenjakovih ploščic ni (sl. 14a). Citoplazma tega dela je svetlejša in izrazito vakuolizirana.



Slika 14 a - b. Razporeditev rumenjakovih ploščic v vitelogeni oociti pozne IV. zoritvene faze. **a.** V robni citoplazmi pod oolemo (P cyt) so manjše rumenjakove ploščice (RPm). Med robno in osrednjo citoplazmo (C cyt) je pas večjih in zelo številnih rumenjakovih ploščic (RPv). V centralni, deloma vakuolizirani citoplazmi blizu jedra rumenjakovih ploščic ni. **b.** Rumenjakove ploščice pod večjo povečavo. **a - b.** Parafinski rezini. **a.** Barvanje Hematoksilin – Eozin. **b.** Barvanje Alizarin red.

4.3.1.2 Rumenjakove ploščice v oociti V. zoritvene faze

V vitelogeni oociti V. zoritvene faze, kjer je premer oocite večji od 2000 μm , rumenjakove ploščice zapolnijo citoplazmo (sl. 15a). V citoplazmi, tik pod oolemo (sl. 15b) so rumenjakove ploščice manjše in številčnejše kot v centralnem delu oocite (sl. 15c).



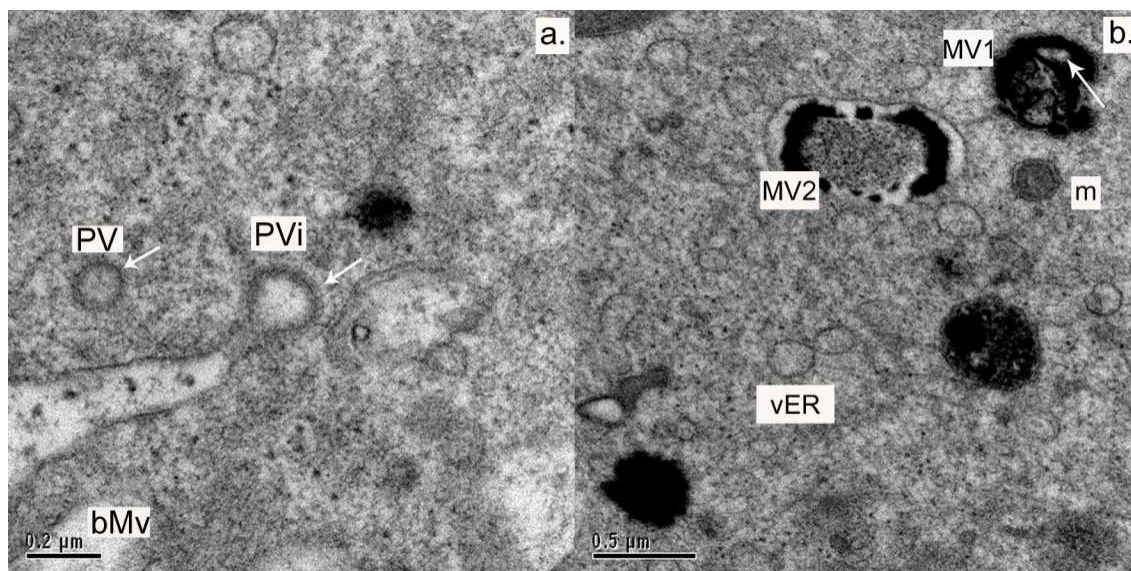
Slika 15 a - c. Rumenjakove ploščice oocite V. zoritvene faze. **a.** Rumenjakove ploščice (RP) zapolnijo celotno citoplazmo oocite. **b.** Manjše in številnejše rumenjakove ploščice robnega dela citoplazme, tik pod oolemo. **c.** Rumenjakove ploščice centralnega dela oocite. **a - c.** Parafinske rezine. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

4.3.1.3 Zrele rumenjakove ploščice in njihove predstopnje

S presevnim elektronskim mikroskopom smo pregledali vzorce vitelogenih oocit, ki ustrezajo IV. zoritveni fazi. Površina oocite je nagubana v številne dolge mikrovile. Na bazi mikrovilov so invaginacije, v kortikalni citoplazmi pa številni vezikli (sl. 16a). Na zunanem obodu veziklov so elektronsko gosta zrna, ki oblikujejo plašč vezikla.

V citoplazmi oocite IV. zoritvene faze so rumenjakove ploščice različnih zrelostnih faz, med njimi tudi zrele (sl. 16b, 17b). V robnem delu citoplazme so zgodnja in pozna multivezikularna telesa, ki so obdana z membrano in vključujejo različno elektronsko gosto vsebino (sl. 16b).

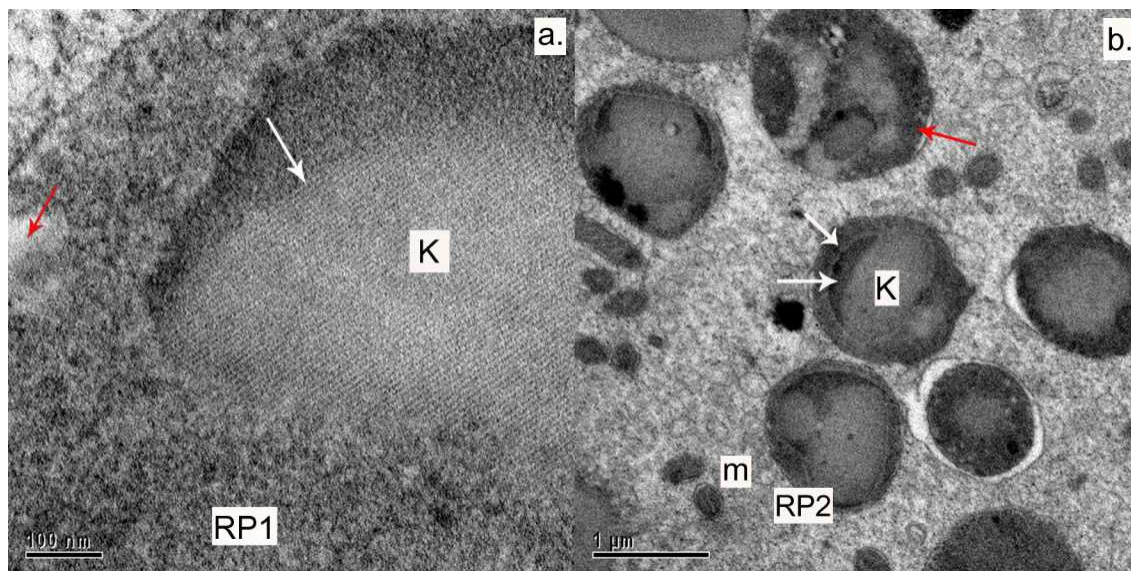
Zgodnje multivezikularno telo je skoraj v celoti zapolnjeno z elektronsko gosto maso, le v centru so elektronsko svetlejši vezikli. Pozna multivezikularna telesa imajo v centru svetlejšo, zrnato vsebino, na periferiji pa so elektronsko goste mase.



Slika 16 a - b. Robna citoplazma vitelogene oocyte IV. zoritvene faze. **a.** Nastajajoč klatrinski vezikel (PVi). bMv – baza mikrovila. bela puščica - zrnat plašč. PV - plaščni vezikel. **b.** Zgodnje multivezikularno telo (MV1) z vezikli (bela puščica) ter pozno multivezikularno telo (MV2). m – mitohondrij. vER – vezikel endoplazemskega retikuluma. **a - b.** TEM posnetek.

V centralnem delu citoplazme so z membrano obdane primordialne rumenjakove ploščice, ki vsebujejo kristalinsko telo, obdano z zrnatim, amorfnim materialom. Ob robu ploščic so elektronsko svetli vezikli (sl. 17a).

V centralnem delu citoplazme so tudi zrele rumenjakove ploščice z enim ali dvema elektronsko svetlima, kompaktnima kristalinskima telesoma (sl. 17b). Kristalinska telesa so obdana z dvema, jasno ločenima slojema (sl. 17b). Notranji sloj je elektronsko gostejši od zunanjega, ki leži tik pod membrano rumenjakove ploščice. Poleg opisanih so prisotne še velike rastoče rumenjakove ploščice z več kristalinskimi telesi ter heterogeno notranjostjo.

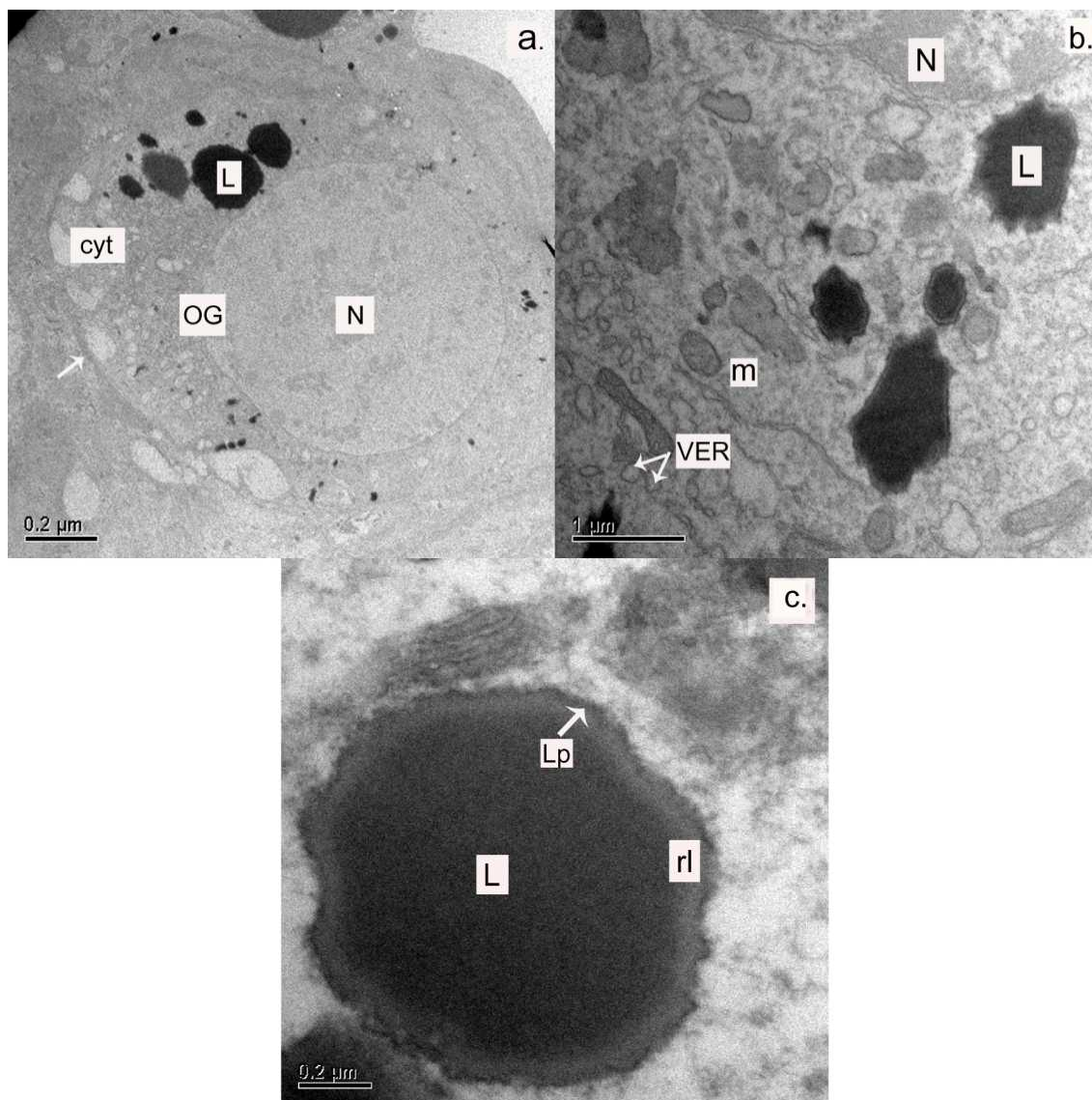


Slika 17 a - b. Centralna citoplazma vitelogene oocite IV. zoritvene faze. **a.** Primordialna rumenjakova ploščica (RP1) s kristalinskim telesom (K) in amorfnim, znatim materialom. Kristalinsko telo je sestavljeno iz kristalinske mreže (bela puščica). Na periferiji ploščice so elektronsko svetli vezikli (rdeča puščica). **b.** Zrela rumenjakova ploščica (RP2) z enim ali dvema kristalinskima telesoma (K). Beli puščici označujeta elektronsko različno gosta sloja na obodu ploščice. Rdeča puščica označuje rastočo rumenjakovo ploščico. m – mitohondrij. **a - b.** TEM posnetek.

4.3.2 Lipidne kaplje

4.3.2.1 Lipidne kaplje v oogonijih

V oogonijih so lipidne kaplje maloštevilne in koncentrirane le na enem polu celice (sl. 18a). V njihovi bližini so mitohondriji, vezikli endoplazemskega retikuluma ter vakuole z elektronsko svetlo vsebino (sl. 18b). Lipidne kaplje so sferične, elektronsko goste strukture s svetlejším robom in elektronsko gostim plaščem (sl. 18c). Lahko so nepravilnih oblik.

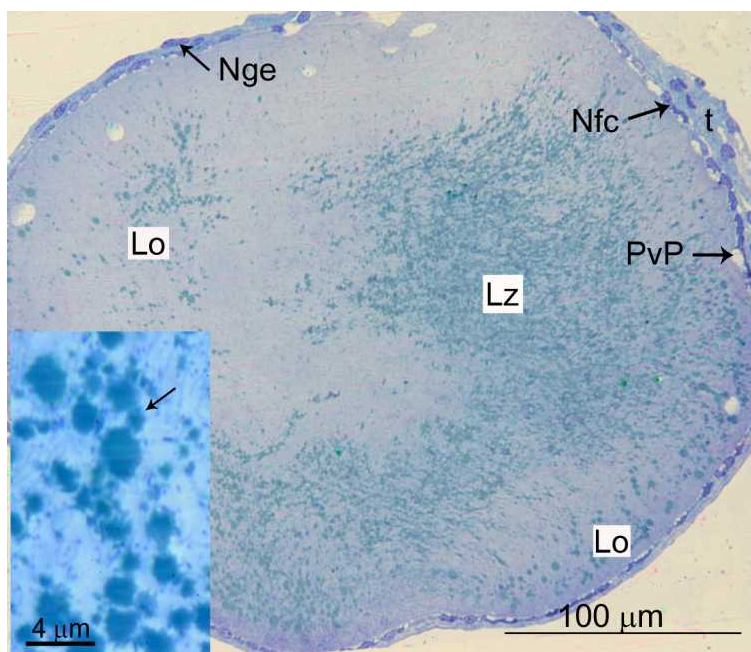


Slika 18 a - c. Oogonij (OG). **a.** V citoplazmi (cyt) je le nekaj večjih lipidnih kapelj (L). **b.** Med lipidnimi kapljami (L) so mitohondriji (m), vezikli endoplazemskega retikula (VER) ter vakuole. **c.** Lipidna kaplja (L) ima elektronsko gosto sredico, svetlejši rob (rl) in elektronsko gost plašč (Lp). bela puščica – plazmalema. N – jedro. **a - c.** TEM posnetek.

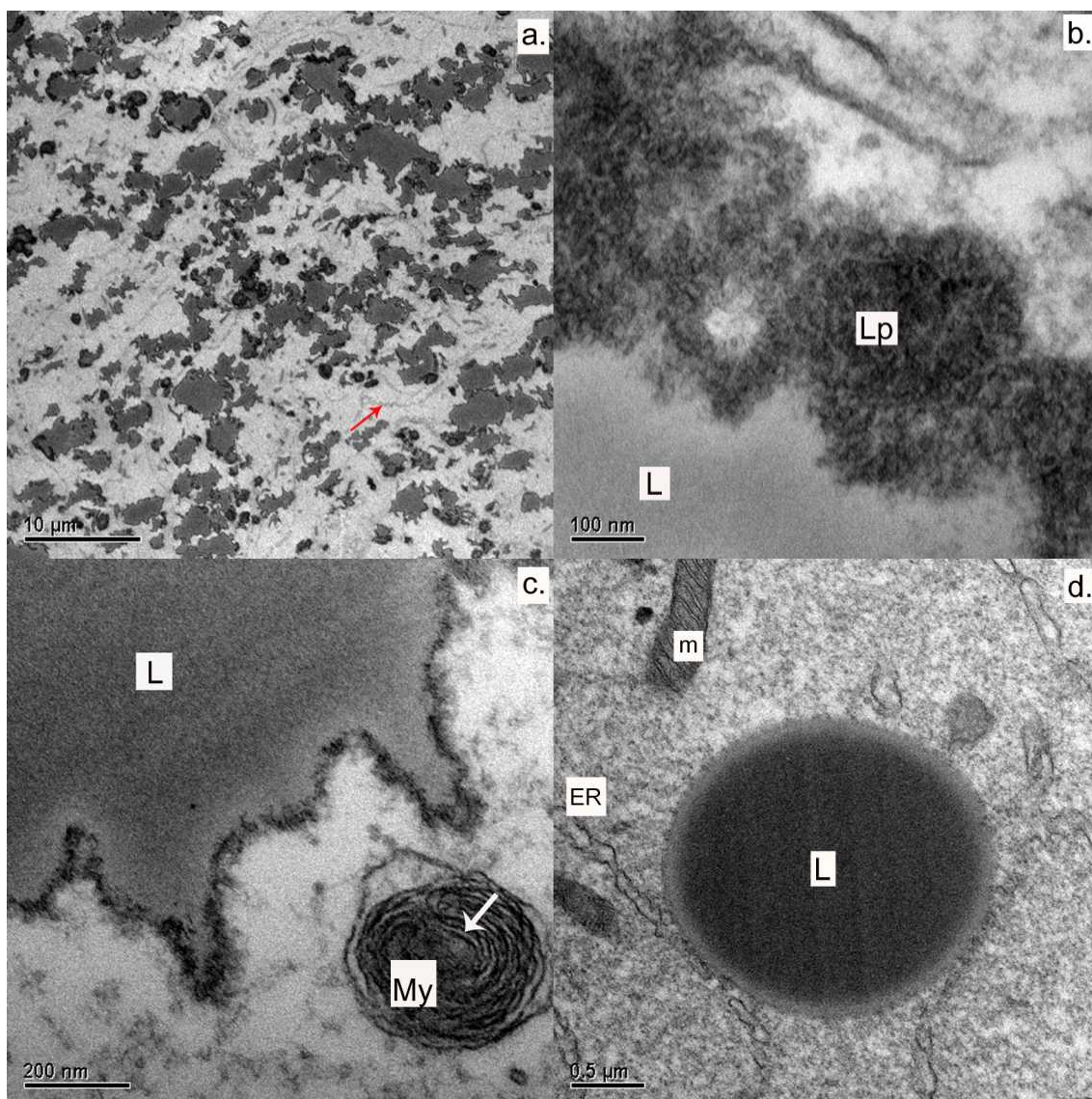
4.3.2.2 Lipidne kaplje v oociti II. zoritvene faze

Zastopanost lipidnih kapelj se v previtelogenih oocitah izrazito poveča (sl. 19). Zapolnjujejo skoraj celotno ooplazmo. Sočasno so v oociti okrogle in izrazito nepravilno oblikovane lipidne kaplje (sl. 20). V centralni citoplazmi oocite z večjo koncentracijo lipidnih kapelj so le te izrazito nepravilnih oblik (sl. 20a), v njenem robnem delu pa je oblika lipidnih kapelj pravilna (sl. 20d). Slednje se pojavljajo tudi v delu citoplazme z manjšo lipidno vsebnostjo. Lipidne kaplje so elektronsko goste s svetlejším robom. Obdaja jih elektronsko gost zrnat plašč, ki je pri nepravilno oblikovanih lipidnih kapljah posebno izrazit (sl. 20b).

V delu citoplazme z nepravilno oblikovanimi lipidnimi kapljami manjše kaplje obdajajo večje (sl. 19 izsek, 20a). Med lipidi so mitohondriji in membrane endoplazemskega retikuluma. Pogosta so tudi mielinska telesa iz krožno naloženih membran (sl. 20c).



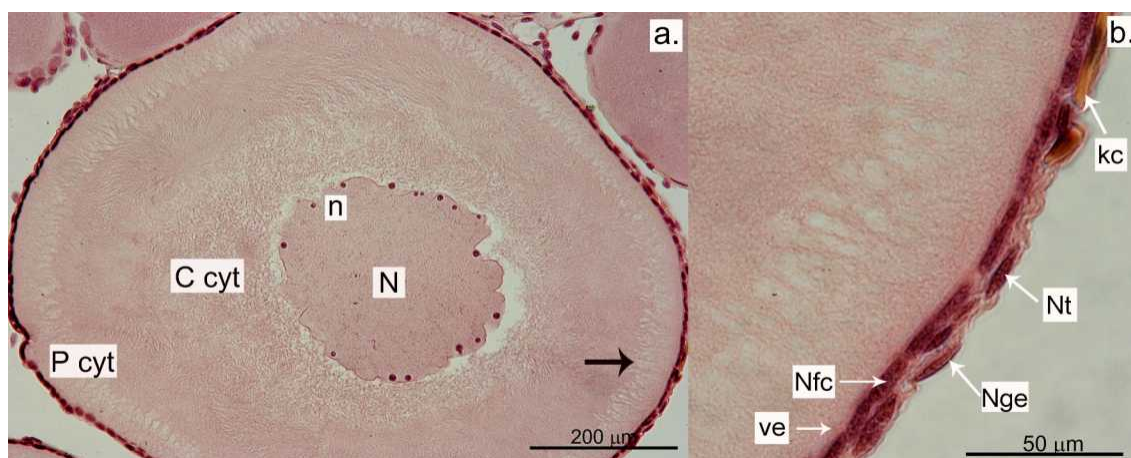
Slika 19. Previtelogena oocita II. zoritvene faze premera 360 μm . V citoplazmi je veliko lipidnih kapelj pravilnih (Lo) in nepravilnih oblik (Lz). **Izsek.** V predelu citoplazme z nepravilno oblikovanimi kapljami, manjše kaplje (črna puščica v izseku) obdajajo večje. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. Nge – jedro celice zunanega epitela. PvP – perivitelin prostor. t – sloj vezivne teke. Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue.



Slika 20 a - d. Lipidne kaplje v citoplazmi previtelogene oocyte II. zoritvene faze. **a.** Območje nepravilno oblikovanih lipidnih kapelj pod manjšo povečavo, kjer poteka zlivanje večjih kapelj z manjšimi. Membrane endoplazemskega retikuluma - rdeča puščica. **b.** Lipidna kaplja (L) z elektronsko gostim, zmatim plaščem (Lp) **c.** Mielinsko telo (My) iz krožno zloženih membran (bela puščica) ob lipidni kaplji (L). **d.** Okrogla lipidna kaplja. ER – endoplazemski retikulum. m - mitohondrij. **a - d.** TEM posnetek.

4.3.2.3 Lipidne kaplje v oociti III. zoritvene faze

Na histoloških rezinah je citoplazma oocit III. zoritvene faze vakuolizirana, saj se lipidi pri pripravi tkiva niso ohranili. Vakuoliziranost citoplazme nakazuje zastopanost lipidnih kapelj predvsem v robnem in centralnem delu citoplazme (sl. 21).



Slika 21 a – b. Vitellogena oocita III. zoritvene faze premera 890 µm. **a.** Vakuolizirana robna (P cyt) in centralna citoplazma (C cyt) nakazujeta zastopanost lipidov, ki se pri pripravi tkiv niso ohranili. **b.** Robna citoplazma pod večjo povečavo. kc – krvna celica N - jedro. n – jedrce. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. Nge – jedro celice zunanjega epitela. Nt – jedro celice vezivne teke. ve – vitelinska ovojnica. **a - b.** Parafinski rezini. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

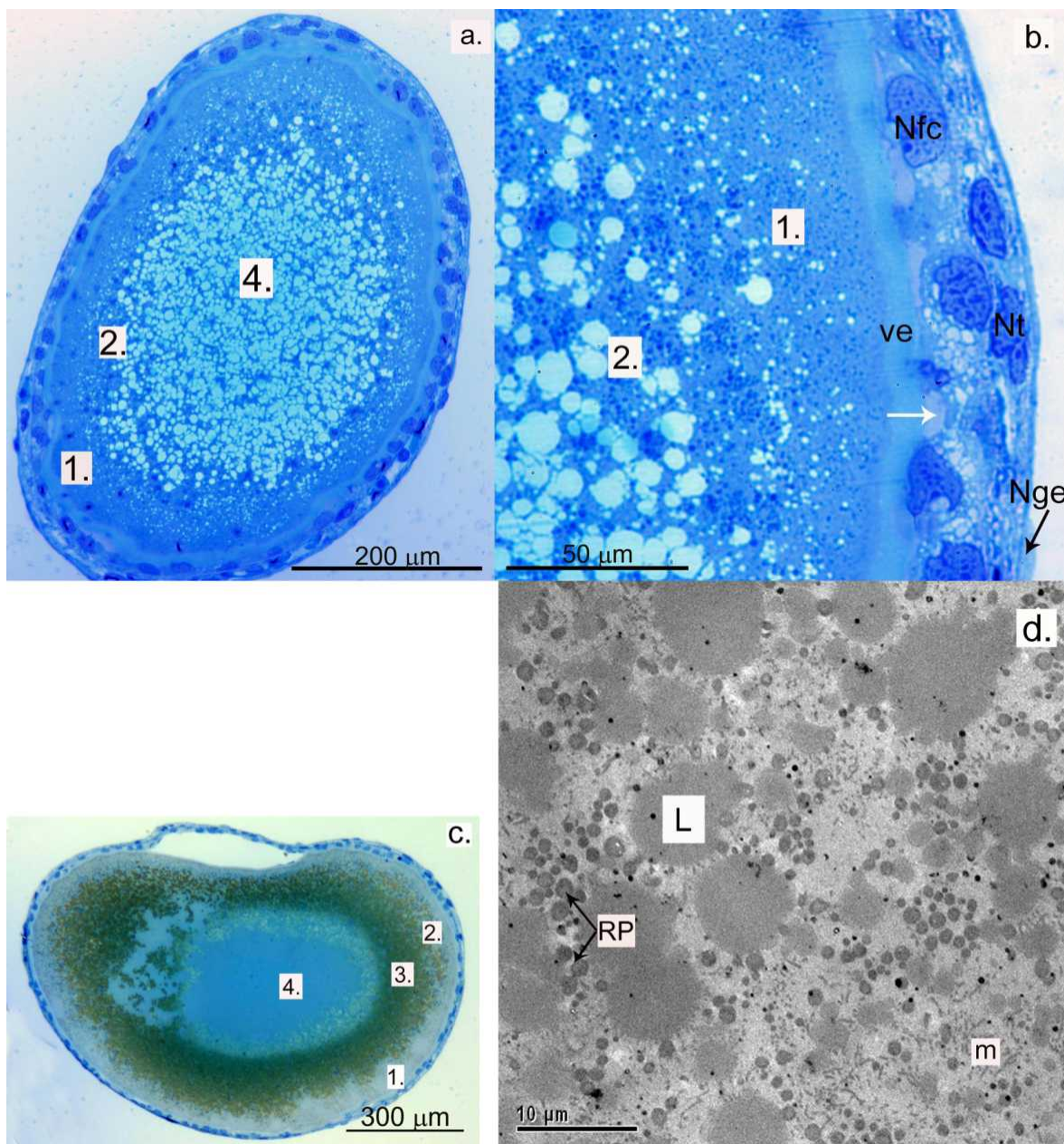
4.3.2.4 Lipidne kaplje v oocit IV. zoritvene faze

Citoplazma vitelogene oocyte IV. zoritvene faze je izrazito slojevita zaradi razporeditve rumenjakovih ploščic in lipidnih kapelj (sl. 22a, c, 23). Opazili smo razlike v ureditvi slojevitosti med vegetalnim, osrednjim ter animalnim polom oocyte.

Na prečnem prerezu vegetalnega pola oocyte so vidni trije sloji: robni, povezovalni in centralni sloj (sl. 22a). V robnem sloju so majhne rumenjakeve ploščice ter maloštevilne, majhne lipidne kapljice (sl. 22b). Slednje so v povezovalnem sloju večje in številčnejše. Večje lipidne kaplje so obkrožene z nekaj manjšimi (sl. 22d). Med lipidnimi kapljami so

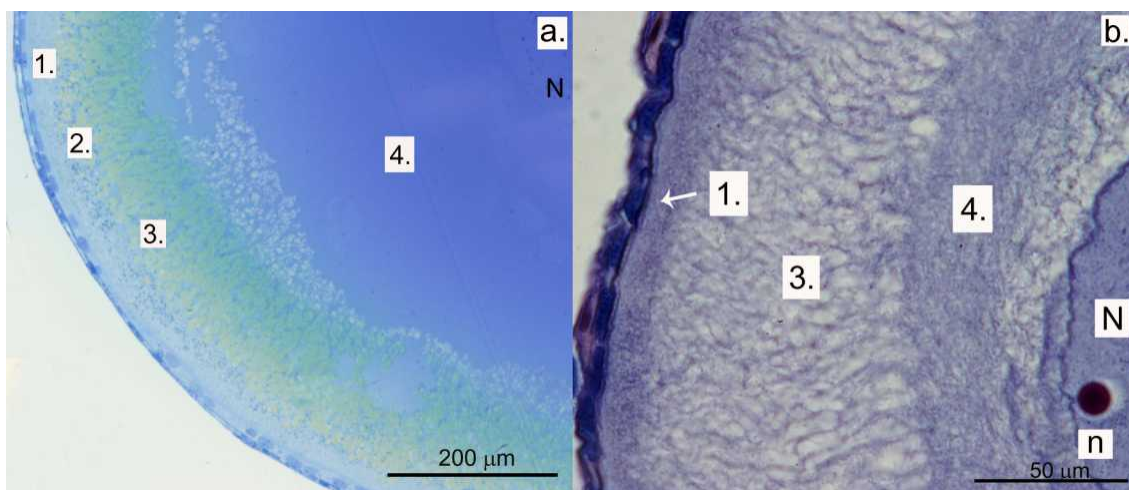
skupki večjih rumenjakovih ploščic (sl. 22b, d). Centralni sloj citoplazme v celoti zapolnjujejo le lipidi (sl. 22a).

Na prečnem prerezu osrednjega dela vitelogene oocite IV. zoritvene faze je citoplazma videti štirislojna (sl. 22c). Robni in povezovalni sloj sta podobna kot na prerezu vegetalnega pola oocite. Lipidni sloj se pomakne bolj na periferijo in je videti brez rumenjakovih ploščic. Koncentracija lipidnih kapljic se postopno zmanjšuje proti homogenemu, centralnemu sloju citoplazme, kjer ni ne lipidnih kapelj ne rumenjakovih ploščic.



Slika 22 a - d. Slojevita ureditev citoplazme vitelogene oocyte IV. zoritvene faze. **a.** Prečni prerez vegetalnega pola oocyte. Citoplazma je urejena v tri sloje: robnega (1.), povezovalnega (2.) in centralnega (4.). **b.** Prečni prerez vegetalnega pola oocyte pod večjo povečavo. Na prehodu robnega (1.) v povezovalni sloj (2.) postajajo lipidne kapljice in rumenjakeve ploščice vse večje in številčnejše. **c.** Prečni prerez osrednjega dela oocyte. Od roba oocyte proti centru si v osrednjem delu oocyte sledijo štirje sloji citoplazme: robni (1.), povezovalni (2.), lipidni (3.) in centralni (4.). **d.** Citoplazma povezovalnega sloja z rumenjakovimi ploščicami (RP) ter lipidnimi kapljami (L). m – mitohondrij. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. Nt – jedro celice vezivne teke. Nge – jedro celice zunanjega epitela. ve – vitelinska ovojnica. bela puščica – perivitelini prostor. **a - c.** Poltanke rezine. Barvanje Azur II Methylene Blue. **d.** TEM posnetek.

Na prečnem prerezu animalnega pola vitelogene oocyte IV. zoritvene faze so prav tako vidni štirje sloji citoplazme s podobno vsebnostjo ter razporeditvijo rumenjakovih ploščic in lipidnih kapelj kot na prečnem prerezu osrednjega dela oocyte (sl. 23). Sloj lipidnih kapelj je nekoliko ožji. Centralna, homogena citoplazma, v kateri se nahaja jedro, se razširi (sl. 23a). Na parafinskih rezinah je razporeditev slojev citoplazme na prečnem prerezu oocyte IV. zoritvene faze podobna opisanim na poltankih rezinah, le da povezovalni sloj ni viden (sl. 23b). Lipidni sloj pa je videti vakuoliziran, ker se lipidi niso ohranili med postopkom priprave parafinskih rezin.

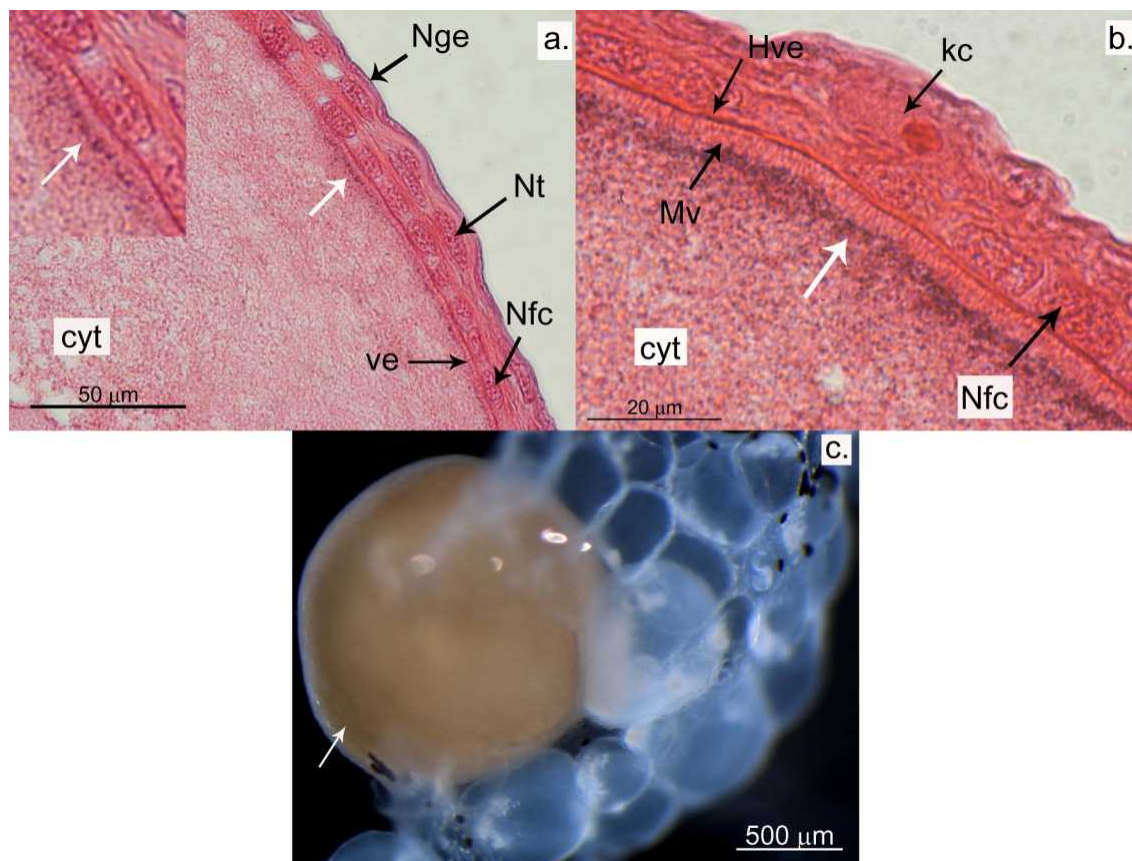


Slika 23 a - b. Prečni prerez animalnega pola vitelogene oocyte IV. zoritvene faze. **a.** Od roba oocyte proti centru si sledijo štirje citoplazemski sloji: robni (1.), povezovalni (2.), lipidni (3.) in centralni (4.) z jedrom (N). **b.** Na parafinski rezini je razporeditev slojev podobna, le da ni izražen povezovalni sloj (2.), lipidni sloj (3.) pa je vakuoliziran. n. jedrce. **a.** Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue. **b.** Parafinska rezina. Barvanje Alizarin red.

4.3.3 Pigmentne granule

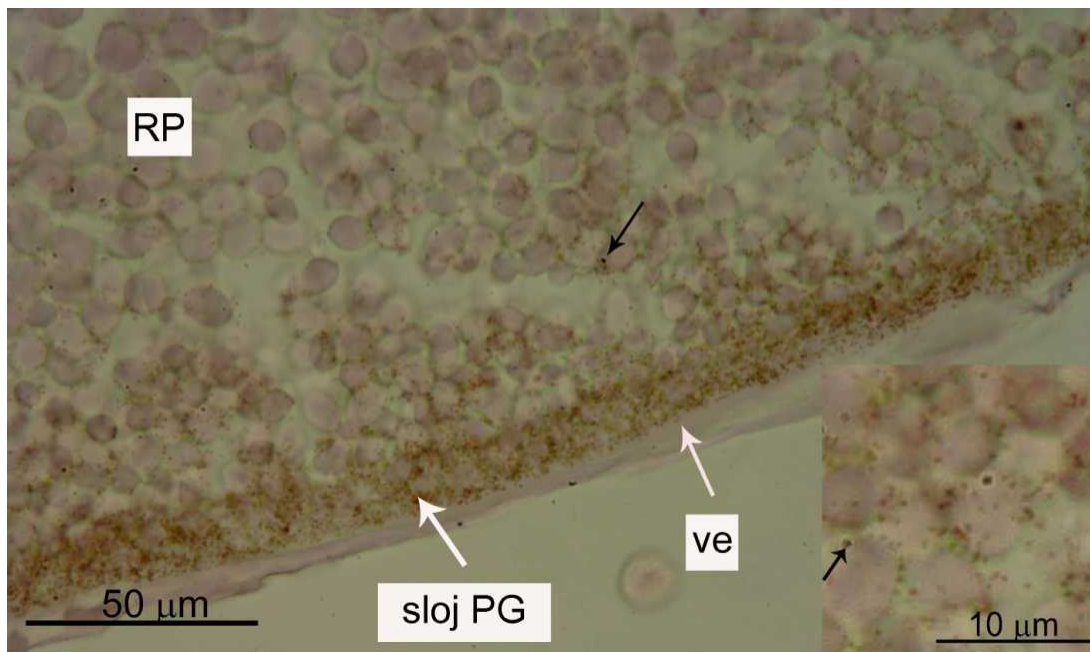
S histokemijskim barvanjem Masson - Fontana smo na parafinskih rezinah identificirali in lokalizirali melaninske granule v oociti.

Pigmentne granule se pojavijo v skupkih tik pod plazmalemo oocyte III. zoritvene faze (sl. 24a). V oociti IV. zoritvene faze se pod plazmalemo oblikuje enakomerno širok sloj pigmentnih granul (sl. 24b). V tej zoritveni fazi je na anatomskem nivoju zunanost oocyte dokaj enakomerno rjavo pigmentirana (sl. 24c).



Slika 24 a - c. Razporeditev pigmentnih granul v oociti III. in IV. zoritvene faze. **a.** V oociti III. zoritvene faze so v citoplazmi (cyt) tik pod plazmalemo vidni posamični skupki pigmentnih granul (bela puščica). **Izsek:** Pigmentne granule (bela puščica) pod večjo povečavo. **b.** V citoplazmi (cyt) oocite IV. zoritvene faze se pod oolemo že oblikuje kontinuiran sloj pigmentnih granul (bela puščica). **c.** Enakomerna pigmentiranost (bela puščica) oocite IV. zoritvene faze. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. Nt – jedro celice vezivne teke. Nge – jedro celice zunanjega epitela. kc – krvna celica v vezivni teki. ve – vitelinska ovojnica. Hve – homogeni sloj vitelinske ovojnice. Mv – mikrovili cone radiate. **a - b.** Parafinski rezini. Barvanje Masson - Fontana. **c.** Stereolupa.

Sloj pigmentnih granul v oociti V. zoritvene faze je tik pod oolemo. Pigmentne granule so razpršene tudi med rumenjakovimi ploščicami robne citoplazme (sl. 25).

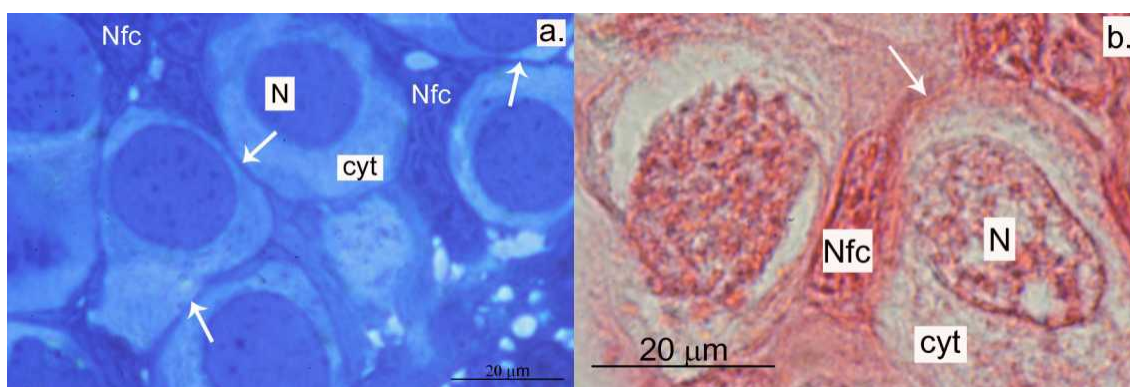


Slika 25. Pigmentne granule v oociti V. zoritvene faze. **Izsek.** Posamične pigmentne granule med rumenjakovimi ploščicami pri večji povečavi (črna puščica). črna puščica – pigmentna granula. RP – rumenjakove ploščice. sloj PG – sloj pigmentnih granul. ve – vitelinska ovojnica. Parafinska rezina. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

4.4 SPREMEMBE FOLIKULARNEGA OVOJA

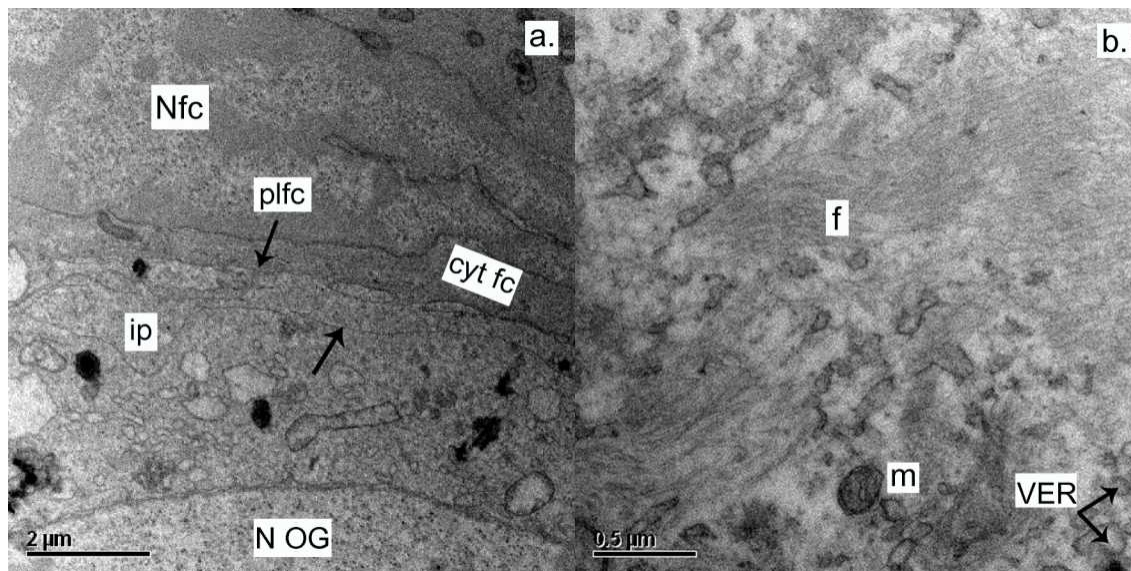
4.4.1 Prefolikularne celice oogonija

Oogonije obdajajo maloštevilne, vretenasto oblikovane prefolikularne celice (sl. 26). Celice ne tvorijo sklenjenega ovoja okrog oogonija, njegova plazmalema meji na plazmalemo prefolikularne celice ter na oolemo sosednjega oogonija (sl. 26).



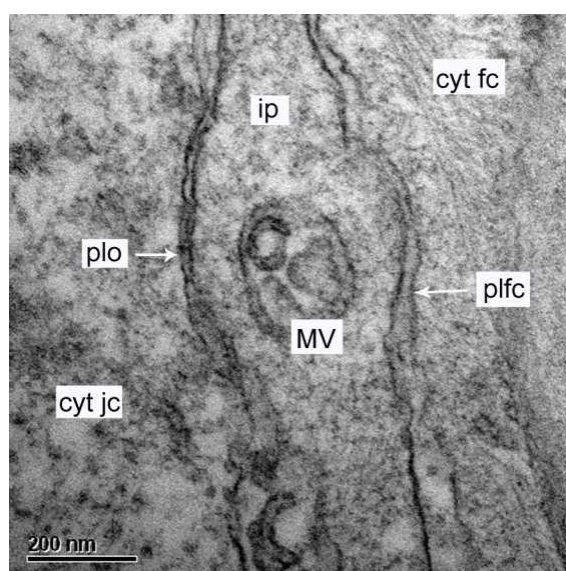
Slika 26 a - b. Razporeditev prefolikularnih celic v gnezdju oogonijev. Jedro prefolikularnih celic (Nfc) je podolgovato in ovalno. Plazmalemi dveh sosednjih oogonijev se stikata (bele puščice). cyt – citoplazma oogonija. N – jedro oogonija. **a.** Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue. **b.** Parafinska rezina. Barvanje Masson – Fontana.

Večino volumna prefolikularne celice zavzema podolgovato ovalno jedro, ki ima jasno ločena območja evkromatina in heterokromatina (sl. 27a). Citoplazme je malo in vključuje intermediarne filamente, mitohondrije, vezikle endoplazemskega retikuluma ter ribosome (sl. 27b).



Slika 27 a - b. Prefolikularna celica oocitja. **a.** Vretenasto oblikovano jedro prefolikularne celice (Nfc) z območji heterokromatina in evkromatina **b.** V citoplazmi prefolikularne celice so intermediarni filamenti (f), mitohondriji (m) ter vezikli ER (v). cyt fc – citoplazma prefolikularne celice. N OG – jedro oocitja. plfc – plazmalema prefolikularne celice. ip - intercelularni prostor. črna puščica – oolema. **a – b.** TEM posnetek.

Med plazmalemo prefolikularne celice in plazmalemo oocitja je medcelični prostor (sl. 28). V njem so vezikli in multivezikularna telesa. Mestoma prihaja do neposrednega stika med prefolikularno celico in oocitjem, ki omogoča prehajanje snovi med celicama.

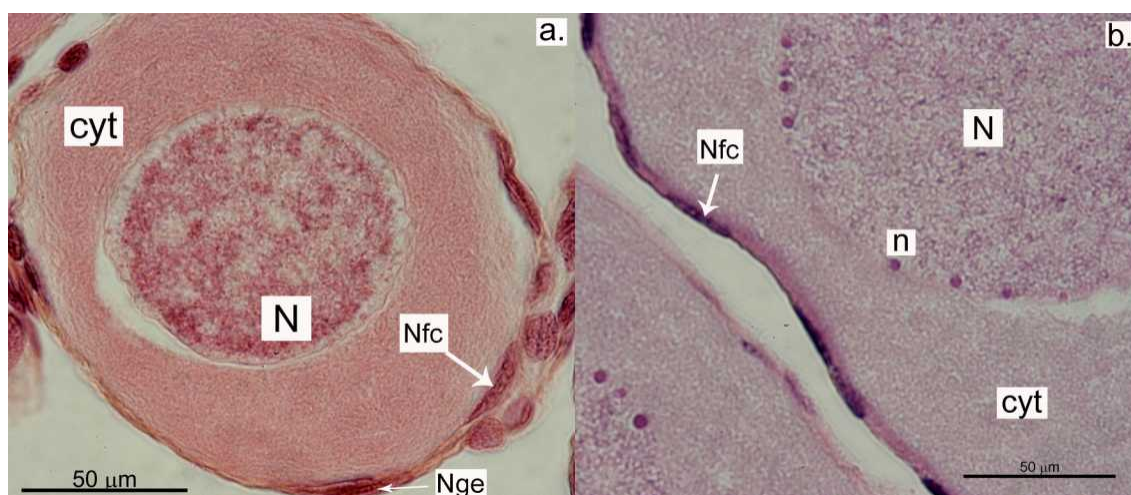


Slika 28. Medcelični prostor (ip) med oolemo (plo) in plazmalemo prefolikularne celice (plfc). cyt fc – citoplazma prefolikularne celice. cyt jc - citoplazma oocitja. MV – multivezikularno telo. TEM posnetek.

4.4.2 Folikularni ovoji oocite I. in II. zoritvene faze

Oocyte I. in II. zoritvene faze obdajajo maloštevilne, sploščene celice folikularnega epitela (sl. 29). Jedra teh celic so podolgovata, vretenasta in zavzemajo večji del volumna celice. Jasno so izražena območja evkromatina in heterokromatina (sl. 30a).

Proti površini ovarija so celice folikularnega epitela obdane s ploščatimi celicami zunanjega epitela ovarija (sl. 29a, 30a). Med epiteloma je tanka vezivna teka (sl. 30).

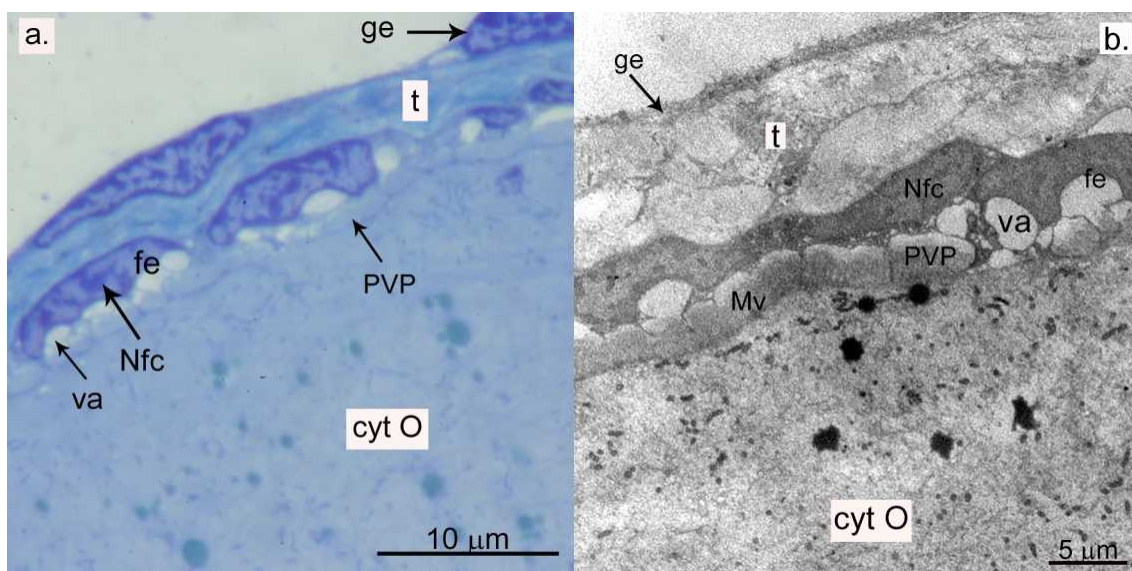


Slika 29 a - b. Sploščen folikularni epitel okoli oocite. **a.** Oocita I. zoritvene faze. **b.** Oocita II. zoritvene faze. cyt – citoplazma oocite. N – jedro oocite. n – jedrce. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. Nge – jedro celice zunanjega epitela. **a - b.** Parafinski rezini. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

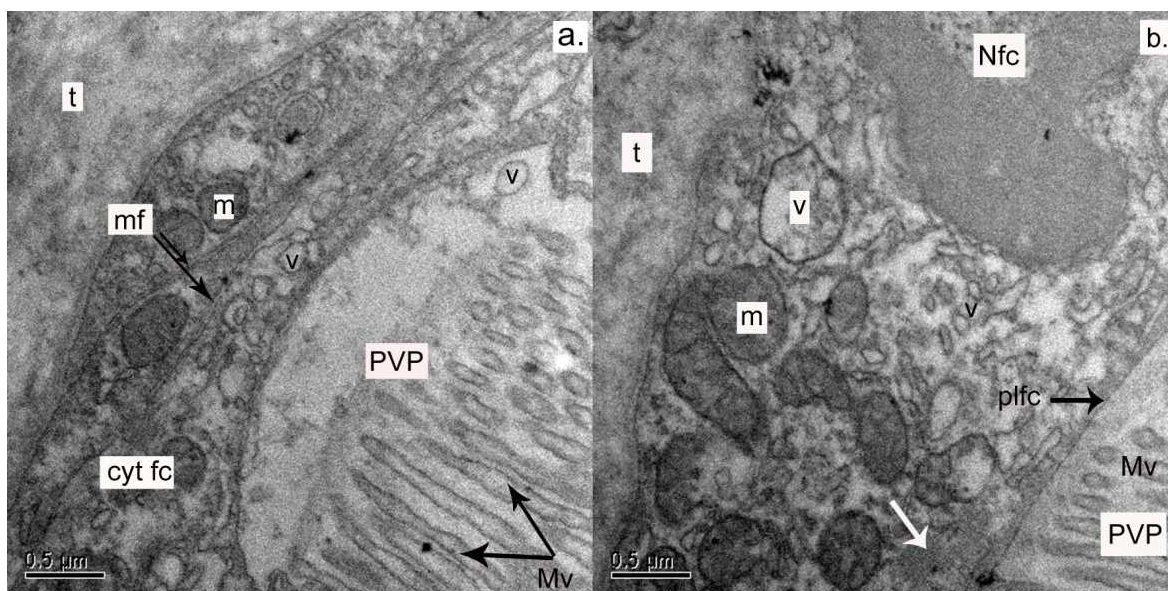
Jedro celic folikularnega epitela oocit II. zoritvene faze je proti oociti režnjasto (sl. 30). V citoplazmi so večje vakuole (sl. 30), mitohondriji, vezikli, intermediarni filamenti, ribosomi ter območja večje elektronske gostote (sl. 31).

Med plazmalemo oocyte II. zoritvene faze in plazmalemo celic folikularnega epitela je perivitelin prostori. V njem so citoplazemski izrastki obeh tipov celic: mikrovili oocyte in makrovili celice folikularnega epitela (sl. 31a, 32a). Posamični dolgi in tanki makrovili celic folikularnega epitela prihajajo v stik z oolemo (sl. 32b). V perivitelin prostoru so vezikli ter material nizke elektronske gostote. Robna citoplazma oocyte ob bazi mikrovilov je elektronsko gostejša od preostale ooplazme (sl. 32a). Površina oocyte je zaradi

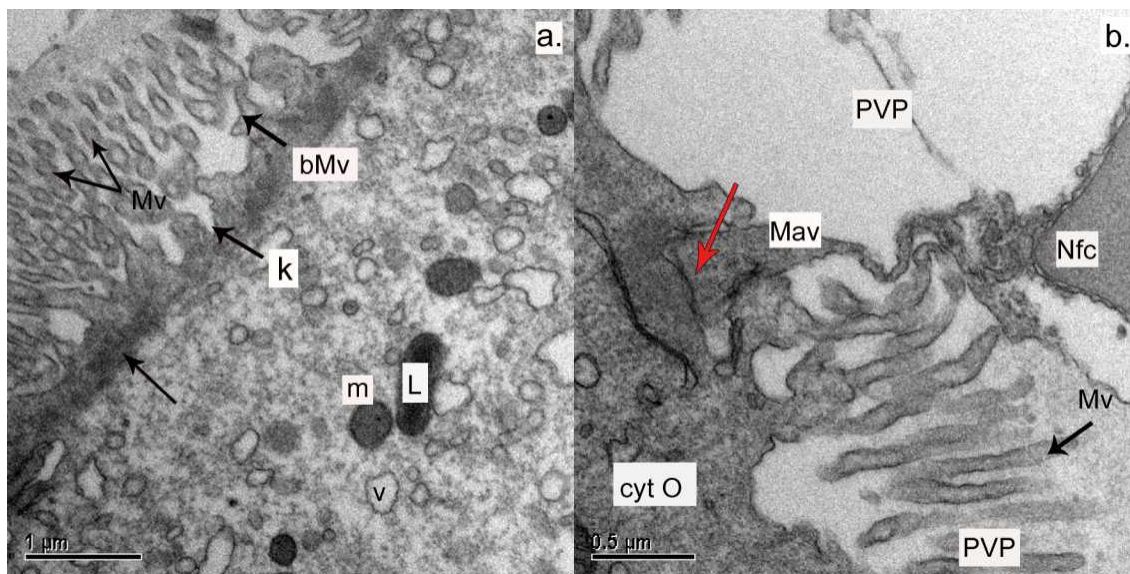
mikrovilov, klatrinskih jarkov in kript (vdolbina med bazami mikrovilov) zelo razgibana. Mikrovile imajo tudi celice zunanega epitela ovarija (sl. 30b).



Slika 30 a - b. Folikularni ovoji oocite II. zoritvene faze. K folikularnemu ovoju prispevajo folikularni epitel (fe), vezivna teka (t) in zunanji epitel ovarija (ge). V citoplazmi celic folikularnega epitela so velike vakuole (va). V perivitelinskem prostoru (PVP) so mikrovili oocyte (Mv) in makrovili celic folikularnega epitela. cyt O – citoplazma oocyte. Nfc – jedro celice folikularnega epitela **a.** Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue. **b.** TEM posnetek.



Slika 31 a - b. Citoplazma celice folikularnega epitela. V citoplazmi (cyt fc) so mitohondriji (m), vezikli (v), intermediarni filamenti (mf), ribosomi ter območja večje elektronske gostote (bela puščica). Mv – mikrovili in makrovili. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. plfc – plazmalema celic folikularnega epitela. PVP - perivitelinini prostor. t – vezivna teka. **a - b.** TEM posnetek.



Slika 32 a - b. Mikrovili in makrovili v perivitelinem prostoru (PVP). **a.** Površina oocyte z mikrovili (Mv), ki izraščajo iz elektronsko gostejše kortikalne citoplazme (puščica). **b.** Makrovil (Mav) folikularne celice se prilega ob oolemo (rdeča puščica). bMv – baza mikrovilov. cyt O – citoplazma oocyte. k – kripta. L – lipidna kaplja. m – mitohondrij. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. v – vezikel. **a - b.** TEM posnetek.

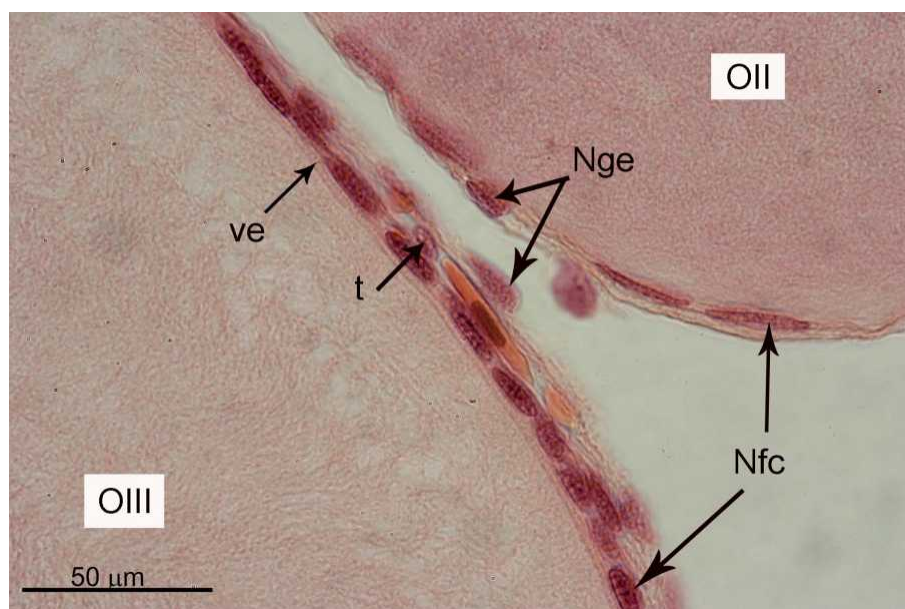
4.4.3 Folikularni ovoj oocyte III. in IV. zoritvene faze

Okoli oocyte III. in IV. zoritvene faze je folikularni ovoj debelejši (sl. 33, 34). Od površine ovarija si sledijo zunanji epitel ovarija, vezivna teka, folikularni epitel in acelična vitelinska ovojnica. Celice folikularnega epitela so številnejše in višje kot v predhodni zoritveni fazi. Njihova jedra so tudi bolj ovalna. Sloj vezivne teke je tudi že ožiljen.

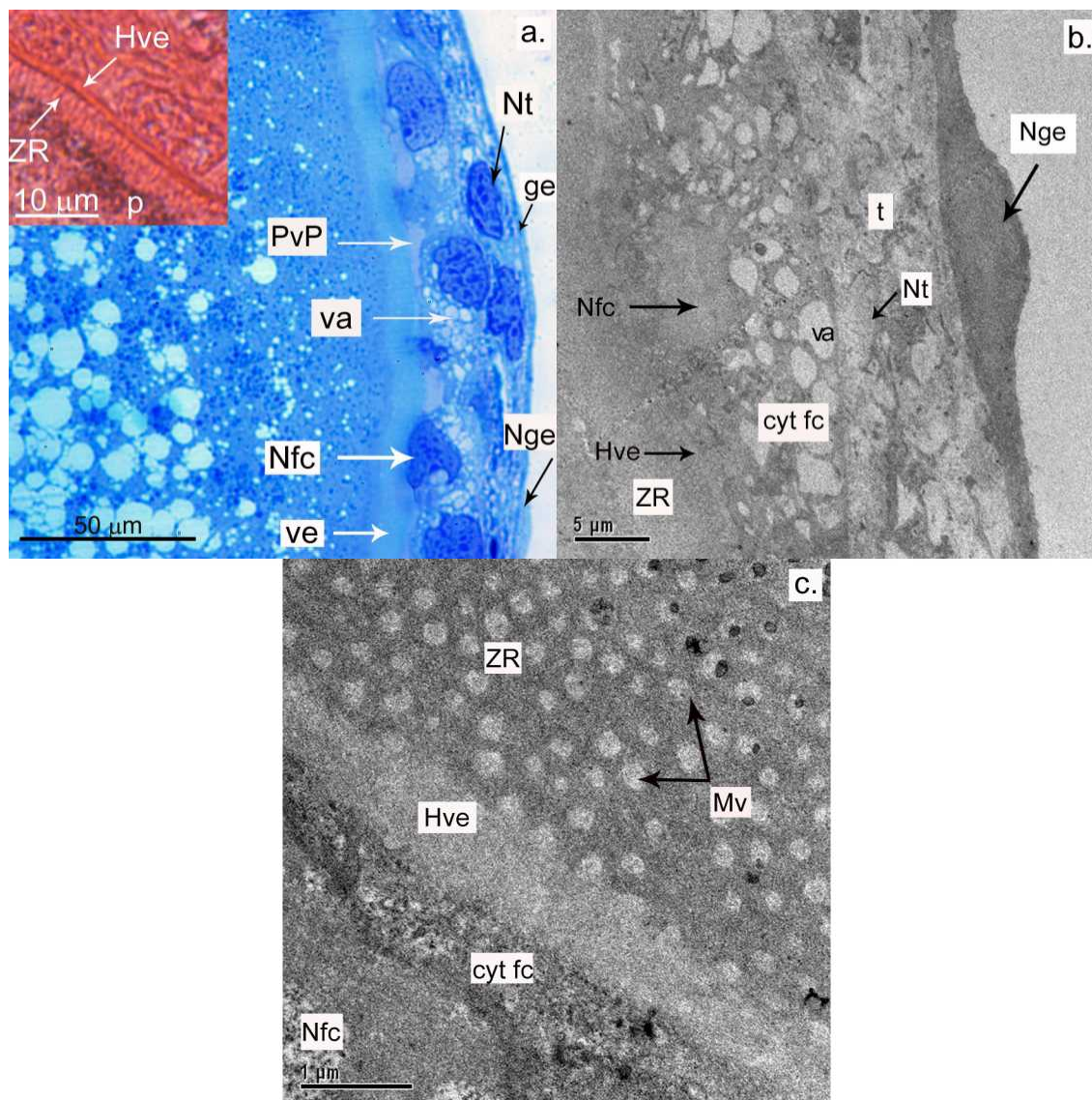
Vitelinska ovojnica oocit III. zoritvene faze je tanka in kontinuirana (sl. 33). Oocyte IV. zoritvene faze pa imajo slojevito vitelinsko ovojnico (sl. 34). V delu perivitelinoga prostora med mikro in makrovili je elektronsko gost pas vitelinske ovojnice, cona radiata, ki je na histoloških rezinah videti progasta (sl. 34a, izsek). Med cono radiato in folikularnim epitelom je elektronsko svetel homogen pas vitelinske ovojnice (sl. 34c).

Celice folikularnega epitela so v IV. zoritveni fazi kubično oblikovane z ovalnim jedrom. Citoplazma je izrazito vakuolizirana (sl. 34).

V vezivni teki je veliko vezivnega tkiva, kolagenih vlaken in krvnih žil. Jedra celic vezivne teke in zunanega epitela ovarija so elipsoidna (sl. 34).



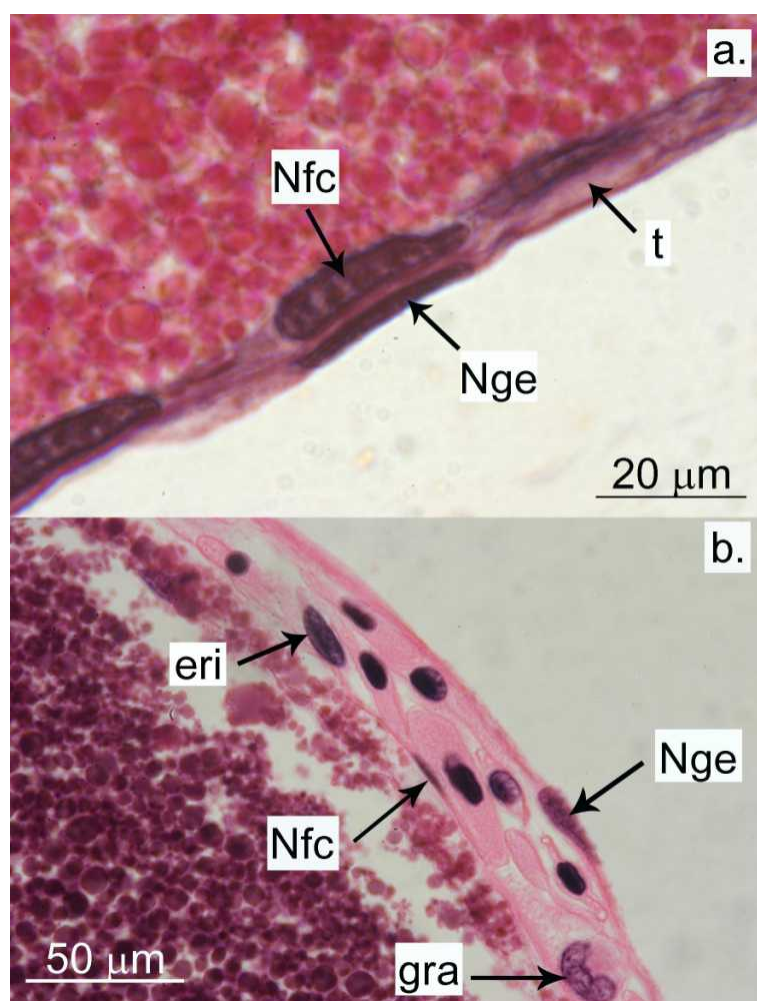
Slika 33. Primerjava folikularnega ovoja II. in III. zoritvene faze. Celice folikularnega epitela oocyte II. zoritvene faze (OII) so manjštevilne ter bolj sploščene od celic folikularnega epitela oocyte III. zoritvene faze (OIII). Vezivna teka (t) okoli oocyte III. zoritvene faze je ožiljena, izrazita je tudi vitelinska ovojnica (ve). Nfc – jedro celice folikularnega epitela. Nge – jedro celice zunanega epitela. Parafinska rezina. Barvanje Hematoksilin – Eozin.



Slika 34 a - c. Folikularni ovoj oocyte IV. zoritvene faze. Jedra celic folikularnega epitela (Nfc) so ovalna, citoplazma je izrazito vakuolizirana (va). **c. in izsek sl.a.** Vitelinska ovojnica (ve) je slojevita, urejena v notranjo cono radiato (ZR) in homogeni zunanji sloj (Hve). cyt fc – citoplazma celice folikularnega epitela. ge – zunanji epitel ovarija. Nge – jedro celice zunanjega epitela. Nt – jedro celice vezivne teke. p - pigmentne granule. PVP – perivitelini prostor. **a.** Poltanka rezina. Barvanje Azur II Methylene Blue oz. Parafinska rezina. Barvanje Masson – Fontana (izsek). **b - c.** TEM posnetek.

4.4.4 Folikularni ovoj v V. zoritveni fazi

Okoli oocyte V. zoritvene fazi si proti površini ovarija sledijo vitelinska ovojnica (sl. 25), ploščati folikularni epitel, ožiljen sloj vezivne teke ter ploščati zunanji epitel (sl. 35a).



Slika 35 a - b. Folikularni ovoj oocyte V. zoritvene faze. **b.** Ožiljena vezivna teka. eri - eritrocit, gra - granulocit. Nfc – jedro celice folikularnega epitela. Nge - jedro celice zunanjega epitela. t – sloj vezivne teke. **a - b.** Parafinski rezini. **a.** Barvanje Alizarin – red. **b.** Barvanje Hematoksilin – Eozin.

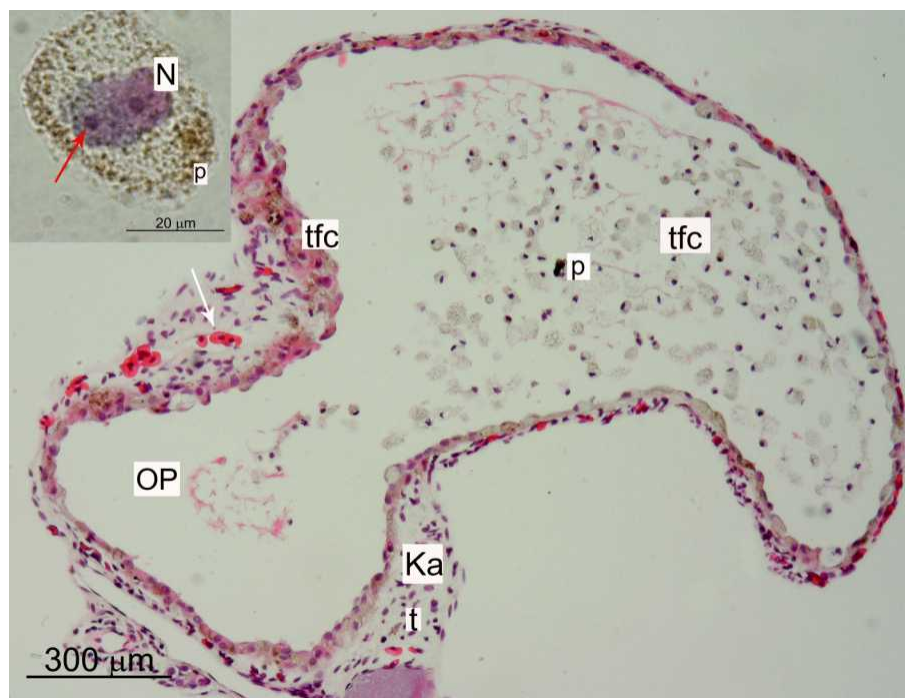
4.5 ATRETIČNA TELESA

Pri pregledu ovarijev s stereolupo smo opazili jajčne celice marmoriranega videza, s premerom od 1150 do 1620 μm (sl. 36). Marmorirane jajčne celice smo izolirali in naredili histološke rezine. Izkazalo se je, da so degenerirajoče oocyte vitelogene faze.



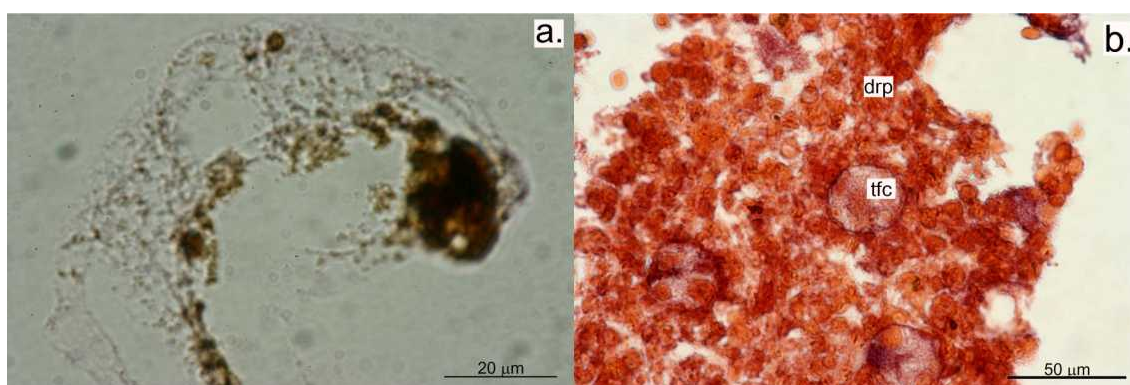
Slika 36. Marmoriran videz degenerirajočih vitelogenih oocit premera oocit od 1150 do 1620 μm . Bela puščica označuje neenakomerno pigmentiranost. Posnetek s stereolupo.

Na histološkem nivoju je takšno vitelogeno atretično telo urejeno v zunanjo celično kapsulo in notranji ovulacijski prostor (sl. 37). Celično kapsulo sestavljajo transformirane celice folikularnega epitela, ožiljena in hipertrofirana vezivna teka ter zunanji epitel. Transformirane celice folikularnega epitela so tudi v ovulacijski prostoru, kamor se infiltrirajo tudi krvne celice. V ovulacijskem prostoru, v celicah folikularnega epitela ter vezivne teke so skupki pigmentnih granul (sl. 38a). Rumenjakove ploščice so večinoma že razgrajene (sl. 38b).



Slika 37. Atretično telo premera 1430 µm iz zunanje celične kapsule (Ka) in notranjega ovulacijskega prostora (OP). Transformirane celice folikularnega epitela (tfc) so v kapsuli in tudi ovulacijskem prostoru. **Izsek.** Folikularna celica pod večjo povečavo z jedrom (N), jedrcema (rdeča puščica) in pigmentnimi granulami (p).

t – vezivna teka. bela puščica – eritrociti. Parafinska rezina. Barvanje Hematoksilin – Eozin.



Slika 38 a - b. Ovulacijski prostor atretičnega telesa pod večjo povečavo. **a.** Melaninski skupki. **b.** Razgrajene rumenjake ploščice (drp) ter transformirane celice folikularnega epitela (tfc). **a - b.** Parafinska rezina. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

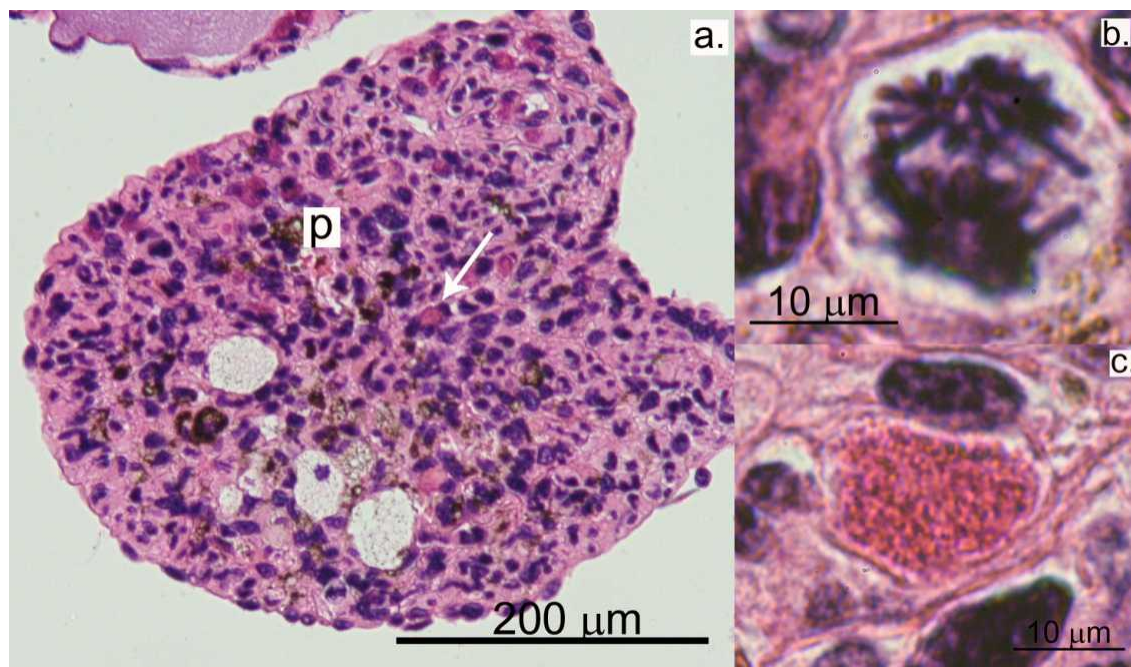
Razen zgoraj opisanega atretičnega telesa sta se v ovarijih pojavljali še dve morfološki obliki vitelogenih atretičnih teles, ki sta se razlikovali od prejšnje glede na spremembe v folikularnem ovoju in v oociti.

Pri atretičnem telesu z nespremenjeno obliko rumenjakovih ploščic (sl. 39) so celice folikularnega epitela hipertrofirale in se vrinile v robno citoplazmo degenerirajoče oocite. V citoplazmi celic folikularnega epitela so pigmentne granule. Celice vezivne teke in zunanega epitela imajo nespremenjen videz. Vitelinska ovojnica pa je že razgrajena.



Slika 38. Atretično telo premera 2800 µm z nespremenjeno obliko rumenjakovih ploščic (RP). tfc - transformirana celica folikularnega epitela. rdeča puščica – pigmentne granule. črna puščica – jedro celice vezivne teke. Parafinska rezina. Barvanje Hematoksilin – Eozin.

Pojavlja se še večcelična oblika atretičnega telesa (sl. 40) iz transformiranih celic folikularnega epitela in pigmentnih skupkov. Premer teh atretičnih teles je bistveno manjši od 100 do 680 µm. Celice folikularnega epitela so pogosto v procesu mitotske delitve (sl. 39b). V večceličnem telesu so tudi zrnate krvne celice, ki se z eozinom obarvajo intenzivno rožnato (sl. 39c).



Slika 40 a - c. Večcelično atretično telo premera 490 µm. **a.** Transformirane folikularne celice, pigmentni skupki (p) ter krvne celice (bela puščica) **b.** Mitotska delitev transformirane celice folikularnega epitela. **c.** Zmata krvna celica pod večjo povečavo. **a - c.** Parafinske rezine. Barvanje Hematoksilin – Eozin

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Reproductivni cikel

5.1.1.1 Faze zoritve jajčnih celic

V ovariju močerila *Proteus anguinus anguinus* so bili do sedaj opisani oogoniji in štiri zoritvene faze oocit; dve previtelogeni in dve zgodnji vitelogeni (Talaber, 2008). Z vključitvijo novih osebkov v raziskavo oogeneze močerila smo v ovariju dveh osebkov od dvaintridesetih našli oocite, ki ustrezajo V. zoritveni fazi. Oocite te faze so večje od dosedanjih, njihov premer je od 2090 do 3380 μm . Citoplazmo oocit zapolnjujejo rumenjake plosčice, jedro pa je pomaknjeno na periferijo. Upošteva je njihovo velikost oocite še niso preovulacijske, saj je velikost odloženih jajčnih celic močerila večja, približno od 4 do 5 mm (ustni vir, Aljančič).

Po Dumontu (1972) je jedro preovulacijske oocite potisnjeno ob njen skrajni rob, folikularne celice okoli nje pa so sploščene, kar opazimo tudi pri oociti V. zoritvene faze močerila. Zaradi slabe ohranjenosti materiala in ker smo imeli v tem primeru na razpolago le parafinske rezine nismo uspeli ugotoviti, kako je z ostalimi značilnostmi, kot so dvoslojna vitelinska ovojnica z manj številnimi mikrovili v preovulacijskem prostoru, poravnost kortikalnih granul tik pod plazmalemo, pomik jedrc v središče jedra ter nagubanost jedrne membrane na vegetalnem polu. Naštete značilnosti bi pripomogle prepoznati preovulacijsko fazo oogeneze od njene predhodne faze.

Velikostni razred in morfološke značilnosti preostalih zoritvenih faz oocit se skladajo z zoritvenimi fazami, ki jih opisuje Iva Talaber (2008). Previtelogene oocite I. zoritvene faze s premerom od 100 do 360 μm so prosojne s prosojnim ali mlečno belim jedrom.

Previtelogene oocyte II. zoritvene faze so še nekoliko prosojne, tako da je jedro še vidno, velike so od 310 do 630 μm . Oocyte III. zoritvene faze so neprosojne, velikosti od 560 do 1050 μm , jedro ni vidno. Oocyte IV. zoritvene faze, premera od 950 do 1800 μm , so enakomerno rjavo pigmentirane zaradi enakomerno širokega sloja melaninskih granul tik pod oolemo.

V ovarijih manjšega števila osebkov močerila smo pod stereolupo prešteli najzrelejše oocyte. To so bile oocyte IV. zoritvene faze, našteli smo jih od 32 do 55. Samica močerila odloži okoli 70 jajc (Aljančič in Aljančič, 1998) in temu ustrezno je tudi število dozorevajočih oocit v ovariju. Število odloženih jajc pri dvoživkah je vrstno specifično (Duellman in Trueb, 1985). V ovariju krempljičarke *Xenopus laevis* je skupno število vitelogenih ter preovulacijskih oocit ocenjeno na približno petnajst tisoč (Callen in sod., 1986). Petina oz. četrtina oocit je v zgodnejši vitelogeni fazi zoritve, delež zrelih preovulacijskih oocit pa od 6 do 7 %.

5.1.1.2 Letno spreminjanje zoritvenih faz v ovariju

Pri sinhronem razvoju oocit dvoživk je zoritev oocit sočasna, v ovariju prevladujejo oocyte le ene zoritvene faze (Sharon in sod., 1997). Med dvoživkami je poznan tudi asinhron razvoj oocit, kjer so sočasno v ovariju oocyte različnih zoritvenih faz. Deleži oocit v različnih fazah zoritve se sezonsko spreminjajo (Pancharatna in Saidapur, 1985). Asinhron razvoj oocit ima tudi močeril, saj so v njegovem ovariju sočasno oocyte različnih zoritvenih faz.

V ovarijih močerila vedno najdemo oogonije ter oocyte I. in II. zoritvene faze ne glede na letni čas. Zastopanost oogonijev in zgodnjih previtelogenih oocit v ovariju neodvisno od letnega časa opisujejo tudi za nekatere brezrepce (Callen in sod., 1980, cit. po Callen in sod., 1986; Sretarugsa in sod., 2001). Pripisujejo jim vlogo zaloge oocit za zoritve. Pri krempljičarki *Xenopus laevis* ter navadni krastači *Bufo bufo* se zaloga previtelogenih oocit pojavi kmalu po metamorfozi in ostane prisotna tekom celotnega reproduktivnega obdobja živali (Jorgensen, 1973, Callen in sod., 1980, cit. po Callen in sod., 1986).

Vitelogene oocyte III. in IV. zoritvene faze najdemo v ovariju močerila kadarkoli med letom, kar je v svoji diplomski nalogi opisala že Iva Talaber (2008). Od letnih časov neodvisna zastopanost vitelogenih oocit v ovariju izkazuje močerilovo sposobnost reprodukcije in odlaganja jajc kadarkoli med letom. To potrjujejo tudi rezultati 35 letne gojitve in razmnoževanja močerila v jamskem laboratoriju v Moulisu v Franciji (Juberthie in sod., 1996), s preferenco odlaganja jajc od oktobra do marca. Pogostejše odlaganje jajc v zimskem obdobju je opazil tudi Aljančič (ustni vir) pri gojitvah in razmnoževanju močerilov v laboratoriju s seminaravnimi pogoji v Tularju pri Kranju. V ovarijih dveh osebkov žrtvovanih v oktobru in februarju smo našli zrelejše oocyte V. zoritvene faze.

Od letnih časov neodvisen cikel oogeneze je zaradi stalnosti razmer značilen za tropske dvoživke (Pancharatna in Saidapur, 1985), seveda pa so reproduktivni cikli bistveno krajši od močerilovega. Ta je zaradi načela energijske skromnosti, ki je nujna za preživetje v s hranili revnih okoljih, prisiljen v daljši, večleten razmnoževalni cikel. Samičke naj bi odlagale jajca v 6 do 7 letnih intervalih (Juberthie in sod., 1996, Aljančič, ustni vir).

5.1.1.3 Povezava dolžine in mase telesa z zrelostjo ovarija

Analiza variance je pokazala, da med dolžino in maso telesa ter zrelostjo oocit v ovariju močerila obstaja povezava. V ovariju daljših in masivnejših osebkov so prisotne oocyte zrelejših zoritvenih faz.

Osebk, ki so bili vključeni v raziskavo, so v dolžino merili od 180 mm do 285 mm. Pri dolžini telesa od 140 do 180 mm so močerili že spolno zreli, reproducirati pa se začno pri dolžini od 200 do 240 mm (Durand in Delay, 1980). Razen ene samice so bile v našo raziskavo zajete spolno zrele samice s sposobnostjo reprodukcije. V ovariju najmanjšega osebk (180 mm) je najzrelejša oocita previtelogena oocita II. faze zoritve. V ovarijih ostalih večjih osebkov pa zasledimo veliko variabilnost v zrelosti ovarijev. Največ osebkov (N=13) je imelo najzrelejše oocyte IV. zoritvene faze, le dva pa oocyte V. zoritvene faze. V nekaj primerih (N=4) pa so bile oocyte II. zoritvene faze najzrelejša faza.

Iz vzorca so bili izključeni ovariji osebkov, ki se niso hranili od 14 do 18 mesecev. Zrelost ovarijev je bila različna, vključevali so bodisi II., III. ali pa IV. najzrelejšo fazo oocit.

Zaradi premajhnega vzorca ne moremo reči ali stradanje vpliva na zrelost ovarija, čeprav Callen in sodelavci (1980, cit. po Callen in sod., 1986) pri stradanih osebkih krempličarke *Xenopus laevis* opisujejo manjšo zrelost oocit od pričakovane.

5.1.2 Strukturne značilnosti oocit v različnih fazah zoritve

5.1.2.1 Jedro in oogeneza

Večina oogonijev v ovariju močerila je v interfazi mitotske delitve. Interfazno jedro je evkromatsko, okroglo, z gladkim jedrnim ovojem (Baker in Franchi, 1967; Abdalla in Cruz – Landim, 2003). Tudi v interfaznem jedru oogonija močerila prevladuje elektronsko svetlejša, nezgoščena oblika kromatina. Heterokromatin se v obliki nepravilno oblikovanih, elektronsko gostih otočkov neenakomerno pojavlja ob notranji jedrni membrani ter v nukleoplazmi. Jedrc v interfaznem jedru oogonija ni opaziti, kar pripisujemo podobnosti s skupki heterokromatina.

V ovariju močerila so oogoniji v gnezdi v različnih fazah mitotske delitve. Nekateri izmed njih imajo režnjasto oblikovano jedro z enim do štirimi jedrci. Režnjata oblika jedra je značilna za jedro v telofazi mitotske delitve (Cross in Mercer, 1993).

Po končanih mitotskih delitvah oogoniji vstopijo v profazo I. mejotske delitve. Jedra oocit I. zoritvene faze v ovariju močerila imajo jasno razločna območja ev- in heterokromatina, v II. zoritveni fazi pa so v njem že vidne tudi posamične kromosomske niti, kar je značilno za pahiten profazo I. mejotske delitve (Gilbert, 2006). V jedrih oocit III. in IV. zoritvene faze so pri močerilu prisotni krtačasti kromosomi. Sestavljeni so iz navidezne osi kromosoma in lateralnih zank. Njihova oblika je v oocitah IV. zoritvene faze še izrazitejša. Značilni so za diploten profazo I. mejotske delitve (Callen in Lloyd, 1960, cit. po Browder in sod, 1980; Sánchez in Villecco, 2003). So pokazatelji visoke stopnje sinteze RNA (Sánchez in Villecco, 2003), zato sklepamo, da sintezna aktivnost močno zaznamuje tudi zgodnji vitelogeni fazi oogeneze močerila.

Številčnost jedrc se pri močerilu v jedrih I. zoritvene faze močno poveča, spremeni se tudi njihova lega. Pri oogonijih se nahajajo v centralnem delu jedra, v jedrih oocite I. zoritvene faze pa ležijo tik pod notranjo jedrno membrano. Migracija jedrc iz centralnega dela jedra proti periferiji je v zgodnji previtelogeni fazi opisana pri kostnicah (Zelazowska in sod., 2007; Cárdenas in sod., 2008) in dvoživkah (Sánchez in Villecco, 2003). V jedrcih poteka intenzivno prepisovanje rRNA. Najbolj izrazito je v pahitenu ter diplotenu profaze I. mejotske delitve (Sánchez in Villecco, 2003), čeprav je največje število jedrc v jedru pri dvoživkah značilno za pahiten (Brachet, 1979). Pri močerilu je število jedrc v jedru največje v II. zoritveni fazi oogeneze, kar kaže na sovpadanje II. zoritvene faze ter pahitena profaze I. mejotske delitve. V jedru oocit III. in IV. zoritvene faze se število jedrc zmanjša, njihova velikost pa poveča. Povečanje velikosti jedrc je prisotno tudi v zgodnji vitelogeni fazi pri krempeljčarki *Xenopus laevis*, vendar se sočasno s spremembo velikosti poveča tudi številčnost jedrc.

Acentrična lega jedra, ki se pojavlja v pozni IV. zoritveni fazi, se razlikuje od njegove centralne lege v predhodnjih fazah. Dumont (1972) oocito, kjer jedro leži izven centralne lege, uvršča v srednjo vitelogeno fazo oogeneze in oocito z jedrom blizu animalnega pola v pozno vitelogeno fazo.

V III. in IV. zoritveni fazi oogeneze močerila je jedrna ovojnica režnjato nagubana. Podobno oblikovanost jedrne ovojnice so v zgodnji vitelogeni fazi opazili pri kostnicah (Srijunngam in Wattanasirmkit, 2001) ter pri dvoživkah (Dumont, 1972; Brachet, 1978; Sretarugsa in sod., 2001). Povezana je s potrebo oocite po večji površini jedrne ovojnice, saj se s tem lahko poveča število jedrnih por in tako tudi količina materiala, ki se prenese v ali iz jedra.

5.1.2.2 Zgradba in razporeditev rumenjakovih ploščic v oocitah

Oocite III. in IV. zoritvene faze v oogenezi močerila uvrščamo v zgodnjo vitelogeno fazo po Dumontu (1972). Zanje je značilno periferno pojavljanje rumenjakovih ploščic in njihova simetrična razporeditev v oociti (Dumont, 1972). Čeprav so za oocito III. zoritvene faze značilne številne lastnosti zgodnje vitelogene faze (Dumont, 1972), kot so krtačasti kromosomi v jedru, kopičenje lipidov v citoplazmi in pigmenta tik pod oolemo, sklenjen

ovoj vitelinske ovojnice, kubični folikularni epitel in ožiljen sloj vezivne teke, pa rumenjake ploščice v njej še niso prisotne. Pojavijo se šele v oocitih IV. zoritvene faze.

IV. zoritveno fazo oocit, ki jo je opisala že Iva Talaber v diplomski nalogi (2008), smo glede na količino in razporeditev rumenjakovih ploščic v citoplazmi razdelili na zgodnjo in pozno. Kopičenje rumenjakovih ploščic v oocitih smo na svetlobno mikroskopskem nivoju opazili v zgodnji IV. zoritveni fazi oogeneze. Njihova največja koncentracija je tik pod oolemo, v pasu kortikalne citoplazme ter v neposredni bližini jedra. V pozni IV. zoritveni fazi se s ploščicami zapolnjeno periferno območje citoplazme razširi. Ureditev je podobna, kot je opisano za brezrepca *Leptodactylus labyrinthicus* (Prado in sod., 2004) ter repato dvoživko *Salamandra salamandra infraimmaculata* (Sharon in sod., 1997).

Peta zoritvena faza oocit, ki smo jo razvrstili v srednjo vitelogeno fazo, pri močerilu še ni bila opisana. Njena citoplazma je zapolnjena z rumenjakovimi ploščicami, jedro pa je izrinjeno na periferijo. Dumont (1972) v opisu srednje vitelogene faze navaja večje in številčnejše rumenjake ploščice na vegetalnem polu kot na animalnem. V oociti V. zoritvene faze pri močerilu nismo razlikovali med rumenjakovimi ploščicami na obeh hemisferah oocite, vendar pa so v robnem delu citoplazme manjše kot v centralnem.

Eksogena sinteza vitelogenina in njegov privzem v oocito z mehanizmom receptorsko posredovane endocitoze sta značilna za kostnice, dvoživke, plazilce in ptice (Browder in sod., 1980; Sánchez in Villecco, 2003; Cárdenas in sod., 2008). Klatrinski jarki, uvihavanja plazmaleme ter plaščni vezikli v robni citoplazmi vitelogene oocite IV. zoritvene faze močerila izkazujejo selektiven privzem vitelogenina s pomočjo receptorsko posredovane endocitoze ali mikropinocitozne.

Izvor vitelogenina pri dvoživkah je predvsem eksogen, vendar se manjši delež sintetizira tudi v oociti (Spornitz in Kress, 1971, cit. po Spornitz in Kress, 1973). Endogen izvor je opisan pri krepljičarki *Xenopus laevis* in pri repati dvoživki *Necturus maculosus* (Spornitz in Kress, 1971, cit. po Spornitz in Kress, 1973; Kessel in Ganion, 1980). Pri kostnici *Piaractus mesopotamicus* endogen izvor vitelogenina povezujejo z zgodnjim centralnim nalaganjem rumenjakovih ploščic (Cruz - Landim, 2000, cit. po Abdalla in Cruz - Landim, 2003). Zgodnje kopičenje rumenjakovih ploščic v citoplazmi, tik ob jedru

smo opazili tudi v oocitah močerila zgodnje IV. zoritvene faze, seveda pa ne moremo trditi da gre za endogeni izvor.

S presevnim elektronskim mikroskopom smo v citoplazmi oocyte IV. zoritvene faze močerila našli zrele rumenjake ploščice in njihove predstopnje. V perifernem delu oocyte so multivezikularna telesa, ki so zgodnja predstopnja rumenjakovih ploščic (Browder in sod., 1980; Pätino in Sullivan, 2002; Sánchez in Villecco, 2003). Z membrano obdani organel vključuje majhne vezikle vitelogenina (Browder in sod., 1980). V njem prihaja do cepitve vitelogenina in njegovih receptorjev (Opresko in Karpf, 1987, cit. po Sánchez in Villecco, 2003) ter do proteolitskega razcepa vitelogenina (Wall in Patel, 1987). Elektronsko goste mase, ki smo jih opazili v notranjosti multivezikularnih teles, so posledica kondenzacije in kristalizacije rumenjakovih proteinov (Villecco in sod., 1999). V robni citoplazmi oocyte so pri močerilu prisotne tudi strukture, ki so podobne multivezikularnemu telesu, le da so večje. Po zgoščeni vsebini v centralnem delu spominjajo na vsebino njegovih veziklov, zato smo sklepali, da gre za pozno obliko multivezikularnega telesa.

Za primordialne rumenjake ploščice je značilna kristalinska struktura (Villecco in sod., 1999), ki jo obkroža gost, granuliran ali amorfen površinski sloj (Kessel in Ganion, 1980). V citoplazmi močerila je prisotna tudi gornjemu opisu podobna struktura, ki jo lahko zaradi vsebnosti kristalinske strukture ter amorfnе obrobe imenujemo primordialna rumenjaka ploščica.

Pri žabi *Rana tigerina* je zrela rumenjaka ploščica urejena v centralno ležeče, elektronsko blede, kompaktno kristalinsko telo in elektronsko gostejši periferni del, obdan z membrano (Karasaki, 1963; Sretarugsa in sod., 2001). Tudi v citoplazmi oocit močerila so zreli rumenjakovi ploščici podobne strukture, le da imajo lahko dve kristalinski telesi in so v robnem delu obdane z dvema jasno ločenima slojema. Notranji sloj je elektronsko gostejši od zunanega, ki leži tik pod membrano rumenjakove ploščice. Večje število kristalinskih teles v rumenjakovi ploščici navajajo pri kostnicah (Kjesbu in Kryvi, 1989).

Zrele rumenjakove ploščice rastejo z medsebojnim zlivanjem (Kjesbu in Kryvi, 1989). Tako je videti tudi pri močerilu, saj so v centralni citoplazmi oocite prisotne velike rumenjakove ploščice z več kristalinskimi telesi. Vsako od njih je obdano z ovojem.

Dumont (1972) opisuje zoritev rumenjakovih ploščic s premiki predstopenj iz robnega dela v centralni del citoplazme. Pri močerilu smo opazili enak potek zorenja, saj so primordialne in zrele rumenjakove ploščice prisotne le v centralnem delu citoplazme.

5.1.2.3 Struktura in razporeditev lipidnih kapljic

V oocitah močerila se med oogenezo spreminja številčnost, velikost, oblikovanost in razporeditev lipidnih kapelj.

Maloštevilne lipidne kaplje smo pri močerilu zasledili že v oogonijih. Koncentrirane so predvsem na enem delu citoplazme oogonija ter so večinoma pravilnih oblik. Zastopanost lipidnih kapelj navajajo pri kostnicah (Selman in Wallace, 1989, cit. po Pätino in Sullivan, 2002), navadnem pupku *Triturus vulgaris* (Spornitz in Kress, 1973) in brezrepca *Bufo stomaticus* (Guraya, 1965), vendar šele v oocitah previtelogene faze, oziroma v zgodnji vitelogeni fazi pri močeradu *Salamandra salamandra infraimmaculata* (Sharon in sod., 1997).

Pri močerilu se število lipidnih kapelj izrazito poveča v previtelogenih oocitah. Lipidne kaplje so različnih velikosti in oblik. Manjše, pravilno oblikovane kapljice so v robni citoplazmi, večje nepravilno oblikovane, ki so obdane z manjšimi, pa v centralnem delu citoplazme. Velikost lipidnih kapljic raste od roba proti centralnemu delu citoplazme, najverjetneje na račun zlivanja lipidnih kapljic. Zaradi zlivanja lipidne kapljice niso le večje, temveč tudi nepravilno oblikovane. Zlivanje lipidnih kapelj omenjajo tudi Sarasquete in sod. (2002) pri modroplavutem tunu *Thunnus thynnus*.

Lipidne kaplje močerila so v vseh fazah oogeneze obdane z elektronsko gostim, zrnatim plaščem, vendar je le-ta intenzivno izražen predvsem okoli nepravilno oblikovanih lipidnih kapelj. Podobno obrobo so opazili pri lipidnih kapljah jetrnih celic močerila (Bizjak Mali,

2002). Vključevala naj bi glikogenske granule. V dosegljivi literaturi omenjene ureditve nismo zasledili.

Citoplazma vitelogenih oocit IV. zoritvene faze močerila je zapolnjena z lipidnimi kapljicami, le objedrna regija je brez lipidov. Veliko lipidov in podobno razporeditev navajajo za oocyte modroplavutega tuna *Thunnus thynnus* (Sarasquete in sod., 2002). Lipidne kaplje v oocitah kostnic so metabolna energijska zaloga embria (Weigand, 1996, cit. po Pätino in Sullivan, 2002). Najverjetneje so pomembna energijska zaloga tudi pri močerilu.

Koncentracija lipidnih kapljic v oociti močerila narašča od periferije proti notranjosti, tj. od robnega in povezovalnega k lipidnemu sloju. V povezovalnem sloju citoplazme lipidne kaplje intenzivno obdajajo skupke rumenjakovih ploščic. Tudi v vitelogenih oocitah navadnega pupka *Triturus vulgaris* (Spornitz in Kress, 1973) so rumenjakove ploščice popolnoma obdane z lipidnimi kapljicami. Villecco in njegovi sodelavci (1999) opisujejo privzemanje lipidnih kapljic v rumenjakove ploščice in njihovo modifikacijo.

V oocitah pozne vitelogene faze pri modroplavutem tunu *Thunnus thynnus* začne zaradi zlivanja lipidnih kapljic v objedrni citoplazmi nastajati homogena lipidna masa (Sarasquete in sod., 2002). Čeprav so v pozni previtelogeni in v zgodnji vitelogeni fazi oogeneze pri močerilu lipidne kaplje prisotne v velikih količinah, pa jih v citoplazmi oocyte V. zoritvene faze zaradi zapolnjenosti z rumenjakovimi ploščicami nismo opazili.

5.1.2.4 Razporeditev pigmentnih granul

Pigmentne granule se pojavljajo predvsem pri tistih vrstah živali, ki jajca odlagajo na mesta izpostavljena dnevni svetlobi (Browder in sod., 1980), saj pigment ščiti jedro in citoplazmo pred škodljivim, mutagenim UV sevanjem. Kljub temu, da močeril živi v podzemnih vodah v stalni temi, so njegove jajčne celice pigmentirane. Oocyte IV. zoritvene faze so s stereolupo videti enakomerno rjavo obarvane.

Skupke pigmentnih granul pri močerilu smo zasledili v oocitah zgodnje vitelogene faze, še preden se v citoplazmi pojavijo rumenjakove ploščice. Oocita III. zoritvene faze še ni rjavo

pigmentirana, kar je značilno za oocyte IV. zoritvene faze, vendar ni več prosojna. Z barvanjem Masson – Fontana smo potrdili, da skupki pigmentnih granul vsebujejo melanin. Predstopnja melanosomov so premelanosomi z malo pigmenta. Na svetlobno mikroskopskem nivoju niso prepoznavni, tako da jih pri močerilu nismo opazili. Opisujejo pa jih za zgodnje vitelogene oocyte dvoživk (Dumont, 1972; Spornitz in Kress, 1973).

Količina pigmenta se v oocitah krempeljčarke *Xenopus laevis* poveča v srednji vitelogeni fazi, ko postane oocita na anatomskem nivoju tudi enakomerno pigmentirana (Dumont, 1972). Pri močerilu se enakomerna svetlo rjava pigmentiranost oocit pojavi že v IV. zoritveni fazi oz. v poznem delu zgodnje vitelogene faze. Takrat je pod oolemo oblikovan enakomerno širok pas pigmentnih granul.

Pri krempeljčarki *Xenopus laevis* v srednji vitelogeni fazi oogeneze animalna hemisfera oocyte ostane rjavo pigmentirana, vegetalna pa postane svetlejša (Dumont, 1972). Pri močerilu smo oocyte V. zoritvenene faze našli le v histoloških preparatih, kjer melaninske granule tvorijo sloj tik pod oolemo. Pod njim pa so med rumenjakovimi ploščicami tudi posamične pigmentne granule.

5.1.2.5 Razvoj in diferenciacija folikularnega ovoja med oogenezo

Oogonije v jajčniku močerila obdajajo prefolikularne celice, ki jih opisujejo tudi pri kostnicah, dvoživkah in sesalcih (Anderson, 1967, Spornitz in Kress, 1973; Guraya, 1965; Al-Mukhtar in Webb, 1971). Pri njih je plazmalema prefolikularnih celic neposredno v stiku s plazmalemo oogonija. Oba tipa celic tudi pri močerilu ločuje le ozek medcelični prostor.

Oogonij se v procesu oogeneze z vstopom v mejozo preoblikuje v oocito, hkrati pa poteka folikulogeneza ali oblikovanje folikularnega epitela (Kjebisu in Kryvi, 1989). Sploščen in maloštevilčen folikularni epitel je značilen za zgodnje previtelogene faze oocit kostnic, repatih in brezrepnih dvoživk (Srijunngam in Wattanasirmit, 2001; Aranzábal, 2003; Prado in sod., 2004; Cárdenas in sod., 2008). Podobno velja za folikularni epitel v zgodnjih previtelogenih fazah oogeneze močerila.

V pozni previtelogeni fazi oogeneze močerila k folikularnemu ovoju prispevajo trije sloji: epitel folikularnih celic, sloj neožiljene vezivne teke in zunanji epitel. Slednji je zaradi maloštevilnih in ploščatih celic podoben zunanjemu epitelu pri kostnicah in dvoživkah (Wischnitzer, 1964; Dumont, 1972; Sretarugsa in sod., 2001). Pri plazilcih se tekom oogeneze epitel splošči (Laughran in sod., 1981). Zunanji epitel ovarija močerila je mikrovilaren, kar opisujejo tudi za nektura *Necturus maculosus* (Kessel in Panje, 1968).

Med oolemo in plazmalemo celic folikularnega epitela se pri močerilu v pozni previtelogeni fazi pojavi širok medcelični prostor ali perivitelini prostor. Vanj se iz elektronsko goste robne citoplazme oocite iztezajo mikrovili, stožčasti citoplazemski izrastki. Površina oocite je dodatno povečana zaradi kript oz. vdolbin citoplazme med bazami mikrovilov ter uvihavane plazmaleme. Kompleksna površina oocite je nastala zaradi potrebe po večjem privzemu snovi iz okolice. Predstavlja tudi zalogo membran, ki se porabljajo pri nastanku mikropinocitoznih veziklov (Massover, 1973).

V perivitelini prostor se iztezajo še makrovili, citoplazemski izrastki celic folikularnega epitela. Daljši in tanjši izmed njih tvorijo celične stike med oocito in celicami folikularnega epitela. Pri krempeljčarki *Xenopus laevis* in ameriški leopardovki *Rana pipiens* sta prisotni dve obliki takšnega celičnega stika: presledkovni stik in dezmosom (Sánchez in Villecco, 2003).

V citoplazmi previtelogenih celic folikularnega epitela so tik pod jedrom vidne velike vakuole. Nagahama (1997) jih pri kostnici *Chirostoma humboldtianum* povezuje s steroidno sintezo hormonov (cit. po Cárdenas in sod., 2008).

Vitelinska ovojnica se pri močerilu oblikuje v III. zoritveni fazi, vendar se v IV. zoritveni fazi odebeli in diferencira v dva sloja: zunanji, tanjši homogeni sloj, ki ga sestavlja amorfni material manjše elektronske gostote ter notranji, širši, elektronsko gostejši sloj cone radiate. Zaradi mikro in makrovilov, ki jo prečijo, ima cona radiata na posnetkih presevnega elektronskega mikroskopa mrežast, na parafinskih rezinah pa progast videz. Podobna razslojitev vitelinske ovojnice je opisana pri repatih dvoživkah (Wischnitzer, 1964; Spornitz in Kress, 1973; Aranzábal, 2003). Pri kostnicah pa vitelinsko ovojnico sestavljata dva ali več slojev, ki se med seboj razlikujejo v elektronski gostoti in strukturi

(Laale, 1980, cit. po Hyllner in Haux, 1994). Sloj se pri kostnicah in dvoživkah debeli do pozne vitelogene faze (Dumont, 1972; Sarasquete in sod., 2002).

Oblika celic folikularnega epitela pri repati dvoživki *Necturus maculosus* v zgodnji vitelogeni fazi oogeneze prehaja iz ploščate v kubično, oblika jeder pa iz vretenaste v ovalno (Kessel in Panje, 1968). V oogenezi močerila so celice folikularnega epitela v III. zoritveni fazi številčnejše in višje kot v predhodnjih fazah, v IV. zoritveni fazi pa so kubičnih oblik z ovalnim jedrom. Folikularni epitel se v V. zoritveni fazi splošči, kar je značilnost pozne vitelogene ter preovulacijske faze pri dvoživkah (Dumont, 1972) in preovulacijske faze pri kostnicah (Sarasquete in sod., 2002).

Sloj vezivne teke postane pri močerilu ožiljen v zgodnji vitelogeni fazi. V III. zoritveni fazi so žile maloštevilne, v IV. in V. zoritveni fazi pa se njihovo število povečuje. Pri krepljčarki *Xenopus laevis* so žile prisotne že v pozni previtelogeni fazi (Dumont, 1972; Aranzábal, 2003).

5.1.2.6 Nastanek in diferenciacija atretičnega telesa

V ovarijih močerila smo našli atretična telesa z različno morfologijo: atretično telo z nespremenjenimi rumenjakovimi ploščicami, atretično telo z razgrajenimi rumenjakovimi ploščicami, ki so pod stereolupo marmoriranega videza in večcelično atretično telo. Gre za propad predvsem vitelogenih oocit. Linares – Casenave in njegovi sodelavci (2002) opisujejo pri vitelogenih oocitah belega jesetra *Acipenser transmontanus* tri faze v procesu nastanka atretičnega telesa: zgodnjo, intermediano in napredno.

Oocyte marmoriranega videza smo izolirali in jih vklopili v paraplast. Izkazalo se je, da so to vitelogene oocyte v fazi degeneracije. Po značilnostih, razloženih v nadaljnjem besedilu, gre za intermediano fazo nastanka atretičnega telesa po Linares - Casenave in sod. (2002). Tudi za degenerirajoče vitelogene oocyte belega jesetra je značilen marmoriran videz (Linares - Casenave in sod., 2002).

Marmorirano atretično telo močerila je oblikovano v zunanjo kapsulo ter notranji ovulacijski prostor. V kapsuli in ovulacijskem prostoru so hipetrofirane celice

folikularnega epitela z melaninskimi granulami. Transformirane folikularne celice imajo fagocitno vlogo; z njihovim vdorom v citoplazmo oocite se začne razgrajevati njena vsebina (Linares - Casenave in sod., 2002; Sarasquete in sod., 2002). Z naraščajočo lizosomsko aktivnostjo transformiranih celic folikularnega epitela se pigmentne granule kopičijo tudi izven teh celic (Linares – Casenave in sod., 2002). Tudi v ovulacijskem prostoru atretičnega telesa pri močerilu so prisotni pigmentni skupki.

Kapsulo atretičnega telesa pri močerilu sestavljajo tudi hipertrofirane celice teke ter nespremenjene celice zunanega epitela. Hipetrofija celic vezivne teke je prav tako značilna za intermediano fazo nastanka atretičnega telesa (Linares - Casenave in sod., 2002), kot tudi infiltracija krvnih celic v ovulacijski prostor. Tudi pri močerilu smo našli krvne celice znotraj ovulacijskega prostora.

Za intermediano fazo nastanka atretičnega telesa je značilna tudi razgradnja rumenjakovih ploščic (Linares - Casenave in sod., 2002). V procesu nastanka atretičnega telesa rumenjakeve ploščice izgubijo svojo integriteto (Sarasquete in sod., 2002). Pojav je prisoten tudi v izoliranem atretičnem telesu močerila. Združevanja rumenjakovih ploščic s pigmentnimi granulami, ki ga opisujejo za krempljičarko *Xenopus laevis* (Dumont, 1972), pri močerilu nismo opazili.

Atretično telo z nespremenjeno obliko rumenjakovih ploščic v ovarijih močerila, ustreza zgodnji fazi nastanka atretičnega telesa. Zanj je značilna nespremenjena oblika rumenjakovih ploščic, vdor hipertrofiranih celic folikularnega epitela v citoplazmo ter razgradnja vitelinske ovojnice (Linares – Casenave in sod., 2002). Sloj vezivne teke in zunanji epitel ostajata nespremenjena.

V napredni fazi nastanka atretičnega telesa se oblikuje večcelično telo vsled intenzivnega pomnoževanja transformirajočih celic folikularnega epitela (Linares - Casenave in sod., 2002). Takšno obliko atretičnega telesa smo našli tudi v ovarijih močerila. Mitotske delitve celic folikularnega epitela izkazujejo njihovo pomnoževanje. Prisotne so tudi pigmentne granule in zrnate krvne celice, ki se s hematoksilinom in eozinom obarvajo intenzivno rožnato. Pigmentni skupki so po končani degeneraciji oocite v tkivu ovarija prisotni še kar

nekaj časa (Linares – Casenave in sod., 2002), kasneje postopno izginejo (Lofts, 1984, cit. po Aranzábal, 2002).

Velikost večceličnih atretičnih teles močerila je bistveno manjša od preostalih dveh opaženih oblik atrezij. Manjšo velikost lahko pripišemo procesu krčenja atretičnega telesa, ki ga pri belem jestrju opisujejo Linares – Casenave in sod. (2002).

5.2 SKLEPI

- V ovariju močerila (*Proteus anguinus anguinus*) so sočasno oogoniji, previtelogene in vitelogene oocite.
- Oogoniji in previtelogene oocite so konstantna zaloga jajčnih celic za zoritve.
- Vitelogene oocite se pojavljajo neodvisno od letnih časov. Zoritev jajčnih celic ni sezonska.
- V ovarijih daljših in masivnejših osebkov so oocite zrelejših zoritvenih faz.
- Najbolj zrele oocite v našem vzorcu ovarijev so oocite V. zoritvene faze, ki še niso preovulacijske.
- Tekom zoritve oocit se spreminja oblika in lega jedra, število jedrc in oblika kromatina. Število jedrc narašča do II. zoritvene faze, kasneje so večja in manj številčna. Za jedra oocit III. in IV. zoritvene faze so značilni krtačasti kromosomi. Pomik jedra iz centra se zgodi v oocitah pozne IV. zoritvene faze, v V. zoritveni fazi pa je stisnjeno ob plazmalemo.
- Rumenjakeve ploščice se pojavijo v oocitah IV. zoritvene faze in zapolnijo citoplazmo oocit V. zoritvene faze. Zorijo in se povečujejo v smeri od robne proti centralni citoplazmi. Glede na razporeditev in količino rumenjakovih ploščic delimo IV. zoritveno fazo v zgodnjo in pozno.
- Maloštevilne lipidne kapljice se pojavijo že v oogonijih, z zorenjem oocit se njihova količina izrazito poveča. Lahko so okrogle ali pa nepravilno oblikovane ter obdane z elektronsko gostim, zrnatim plaščem.
- Melaninske granule se pojavijo v oocitah III. zoritvene faze. V oocitah IV. zoritvene faze oblikujejo kontinuiran sloj pod oolemo, tako da so oocite enakomerno rjavo pigmentirane.
- Z zorenjem oocite se število ter oblika celic folikularnega epitela spreminjata. Ožiljenost vezivne teke zasledimo v III. zoritveni fazi, in se intenzivira v zrelejših fazah.

- Vitelinska ovojnica se oblikuje v III. zoritveni fazi in se v IV. zoritveni fazi diferencira v zunanji homogeni sloj ter notranji sloj cone radiate.
- Mikrovili oocit ter makrovili celic folikularnega epitela se pojavijo pri oocitah II. zoritvene faze. Njihovo število in dolžina postopoma naraščata.
- Jajčne celice marmoriranega videza so degenerirajoče oocyte vitelogene faze. Vitelogena atretična telesa so vsaj 3 različnih morfoloških tipov: atretično telo z nespremenjenimi rumenjakovimi ploščicami, atretično telo z degenerirajočimi rumenjakovimi ploščicami in večcelično atretično telo.

6 POVZETEK

Ovarije nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) smo pregledali s stereolupo, svetlobnim mikroskopom in presevnim elektronskim mikroskopom. Imeli smo ovarije 30-ih osebkov. Večina ovarijev je bila pripravljena samo za svetlobno mikroskopski nivo. Z nalogo dopolnjujemo rezultate, opisane v diplomskem delu Ive Talaber (2008).

V nalogi dodatno opisujemo V. zoritveno fazo oocit. Do sedaj so bile opisane štiri faze zoritve oocit, dve previtelogeni in dve vitelogeni fazi (Talaber, 2008). Oocyte V. zoritvene faze so prav tako vitelogene, s premerom od 2090 do 3380 μm . Najverjetneje še niso preovulacijske, saj so zrele jajčne celice močerila velike od 4 do 5 mm. Podrobneje opisujemo spremembe v jedru tekom zoritve oocit, pojavnost, razporeditev in zoritv rumenjakovih ploščic, zastopanost in izgled lipidnih kapelj, zastopanost pigmentnih granul, spremembe folikularnega epitela in plastovito ureditev vitelinskega ovoja. Dopolnjujemo tudi morfologijo atretičnih teles.

Upošteva je velikostni razred in morfološke značilnosti, se naši rezultati skladajo z zoritvenimi fazami, ki jih opisuje že Iva Talaber (2008). Previtelogene oocyte I. zoritvene faze s premerom od 100 do 360 μm so prosojne s prosojnim oz. mlečno belim jedrom. Previtelogene oocyte II. zoritvene faze so še nekoliko prosojne, tako da je jedro še vidno, velike so od 310 do 630 μm . Oocyte III. zoritvene faze so neprosojne, velikosti od 560 do 1050 μm , jedro ni vidno. Oocyte IV. zoritvene faze, premera od 950 do 1800 μm , so enakomerno rjavo pigmentirane zaradi enakomerno širokega sloja melaninskih granul tik pod oolemo.

Razen oocit so v steni ovarija tudi oogoniji, premera od 13 do 83 μm , ki so bodisi posamično ali pa v skupini oz. gnezdu, ki šteje od nekaj do preko dvajset oogonijev. Običajno jih najdemo ob zrelejših oocitah. Med oogoniji v gnezdih so pogoste mitotske delitve, ki se pojavljajo neodvisno od letnega časa. Večina oogonijev je v interfazi mitotske delitve.

V ovarijih vseh samic (N= 30), neodvisno od letnega časa, so prisotni oogoniji ter oocyte I. in II. zoritvene faze, ki so zaloga oocit za nadaljnje zoritve. V večini ovarijev (N=22) so prisotni kadarkoli med letom tudi vitelogene oocyte III. oziroma IV. zoritvene faze. Le v dveh primerih smo našli tudi zrelejše oocyte V. zoritvene faze. Pojavnost vitelogenih oocit tekom leta izkazujejo močerilovo sposobnost reprodukcije in odlaganja jajc preko celega leta, ki jo opisujejo Juberthie in sod. (1996). Navajajo tudi večjo preferenco odlaganja jajc od oktobra do marca. Tudi v našem primeru smo našli najbolj zrele oocyte V. zoritvene faze pri samicah, žrtvovanih oktobra in februarja.

Med dolžino in maso telesa ter zrelostjo oocit v ovariju močerila obstaja povezava. V ovariju daljših in masivnejših osebkov so oocyte zrelejših zoritvenih faz.

Z zorenjem oocyte se spreminja oblika ter lega jedra, oblika jedrne ovojnice, število jedrc in oblika kromatina. Število jedrc narašča do II. zoritvene faze, kasneje so večja in manj številčna. Okrogla jedra previtelogenih oocit I. in II. zoritvene faze ležijo v središču oocyte. V jedru I. zoritvene faze se izmenjujejo območja evkromatina in heterokromatina, v jedru II. zoritvene faze so že razpoznavne posamezne kromosomske niti. Oocyte III. in IV. zoritvene faze so v diploten fazi I. mejotske delitve, v jedrih so značilni krtačasti kromosomi, ki izkazujejo visoko stopnjo sinteze RNA. V pozni IV. zoritveni fazi leži jedro izven centralne lege, v V. pa je stisnjeno pod plazmalemo.

Glede na razporeditev in količino rumenjakovih ploščic smo oocyte IV. zoritvene faze razdelili na zgodnjo in pozno fazo. V zgodnji fazi se rumenjakeve ploščice kopičijo v citoplazmi tik ob jedru ter v ozkem pasu pod oolemo. V pozni fazi pa se robni sloj rumenjakovih ploščic razširi. S presevnim elektronskim mikroskopom smo opazili, da rumenjakeve ploščice zorijo od robne citoplazme proti centru, kar je značilno tudi za ostale dvoživke. V robni citoplazmi so zgodnejše predstopnje rumenjakovih ploščic, proti centralni citoplazmi pa so primordialne in zrele oblike rumenjakovih ploščic. Od periferije proti centru narašča tudi njihova velikost. V oocitah V. zoritvene faze rumenjakeve ploščice v celoti zapolnijo citoplazmo.

Lipidne kapljice so značilne za oogonije in oocyte močerila. Količina sprva maloštevilnih lipidnih kapljic oogonija se izrazito poveča v oocitah previtelogene faze. Lipidne kapljice so

bodisi okrogle ali pa izrazito nepravilnih oblik z elektronsko gostim, zrnatim plaščem. Nepravilno oblikovanost lipidnih kapelj pripisujemo medsebojmu zlivanju. V citoplazmi oocite IV. zoritvene faze so razen lipidnih kapljic tudi rumenjakeve ploščice. Lipidne kaplje in rumenjakeve ploščice so urejene slojevito. Kako je z lipidnimi kapljami v oocitah V. zoritvene faze, žal ne vemo, saj smo imeli na razpolago samo parafinske rezine in se lipidi pri pripravi tkiva niso ohranili.

Oogenezo spremlja tudi folikulogeneza. Okoli ogonijev so maloštevilne prefolikularne celice, ki tvorijo nesklenjen epitel, tako da so sosednji ogoniji v neposrednem stiku. Oocite I. in II. zoritvene faze že obdaja ploščati epitel folikularnih celic, ki postanejo v III. in IV. zoritveni fazi kubično oblikovane in številnejše. Folikularni epitel se v V. zoritveni fazi oocit ponovno splošči.

Vitelinska ovojnica se pojavi v III. zoritveni fazi oocit in se v IV. zoritveni fazi diferencira v zunanji homogeni sloj ter notranji sloj zone radiate, ki je prepleten z mikro in makrovili. Ti citoplazemski izrastki s povečanjem površine omogočajo večji privzem snovi iz okolice. Od III. zoritvene faze oocit dalje je vezivna teka folikla ožiljena.

Marmoriran videz oocit je značilen za degenerirajoče oocite vitelogene faze. Ob upoštevanju sprememb folikularnega ovoja in oocite lahko razlikujemo 3 morfološke tipe. Pri morfološkem tipu z nespremenjenimi rumenjakovimi ploščicami se hipertrofirane celice folikularnega epitela z melaninskimi granulami pojavljajo tudi v citoplazmi degenerirajoče oocite. Vitelinske ovojnice ni več. Ostali sloji folikularnega ovoja so nespremenjeni. Atretično telo z degenerirajočimi rumenjakovimi ploščicami je drugi morfološki tip atrezije. Grajeno je iz zunanje kapsule ter notranjega ovulacijskega prostora. Kapsulo sestavljajo transformiran folikularni epitel, hipertrofirana vezivna teka ter nespremenjen zunanji epitel. V ovulacijskem prostoru pa so razen transformiranih celic folikularnega epitela, degenerirajočih rumenjakovih ploščic še krvne celice in melaninske granule. Večcelično atretično telo je še ena oblika atrezije, sestavljajo ga pigmentni skupki, krvne celice ter transformirane celice folikularnega epitela. Mitotske delitve celic folikularnega epitela izkazujejo njihovo pomnoževanje.

7 LITERATURA

7.1 CITIRANI VIRI

1. Abdalla F.C., Cruz-Landim C. 2003. Some histological and ultrastructural aspects of oogenesis in *Piaractus mesopotamicus* Holmerg, 1887 (Teleostei). Braz. J. Morph. Sci., 20: 3-10
2. Aljančič M., Aljančič G. 1998. Žival meseca oktobra: Človeška ribica (*Proteus anguinus*). 61, 2:85
3. 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
4. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. 4th edition. New York. Garland Science, Taylor in Francis Group, Inc., ZDA
5. Albertini D.F., Anderson E. 1974. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. J Cell Biol, 63: 234-250
6. Anderson E. 1967. The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts. J Cell Biol, 35, 1: 193-212
7. 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

8. Baker T.G., Franchi L.L. 1967. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J Cell Sci*, 2: 213-224
9. Bizjak-Mali L. 2002. Vpliv stradanja na ultrastrukturo hepatocitov močerila (*Proteus anguinus*, *Amphibia*, *Urodela*). Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani
10. Bou-Resli M. 1974. Ultrastructural studies on the intercellular bridges between the oocyte and follicle cells in the lizards *Acanthodactylus scutellatus* Hardy. *Anatomy and Embryology*, 143, 3: 239-254
11. Bozzola J.J., Russel L.D. 1991. Electron microscopy. 2nd edition. Jones and Bartlett Publishers, ZDA
12. Brachet J. 1979. Oogenesis and maturation in amphibian oocytes. *Endeavor*, 3: 144-149
13. Brizzi R., Corti C. 2006. Reproductive cycles of the European amphibians: A brief history of studies on the role of exogenous and endogenous factors. In: Bonnensis II. Proceedings of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica. Vences M., Köhler J., Ziegler T., Böhne W. (eds.): 27-30
14. Browder L.W., Erickson C.A., Jeffrey W.R. 1980. Developmental biology. 3th edition. Harcourt Brace College Publishers, ZDA
15. 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
16. Cabada M.O., Sanchez Riera A.N., Genta H.D., Sanchez S.S., Barisone G.A. 1996. Vitelline envelope formation during oogenesis in *Bufo arenarum*. *Biocell*, 20, 1: 77-86
17. Callen J.C., Dennebouy N., Mounolou J.C. 1986. Early onset of a large pool of previtellogenic oocytes and cyclic escape by vitellogenesis: the pattern of ovarian

activity of *Xenopus laevis* females and its physiological consequences. *Reprod Nutr Dévelop*, 26: 13 – 30

18. Cárdenas R., Chávez M., González J.L., Aley P., Espinoza J., Jiménez – Garcia L.F. 2008. Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Revista de biología tropical*, 56, 4: 1825-1835
19. Chang P., Torres J., Lewis R.A., Mowry K.L., Houliston E., King M.L. 2004. Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 15, 10: 469-481
20. Coggins L.W. 1973. An ultrastructural and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis*. *J Cell Sci*, 12: 71-93
21. Cross P.C., Mercer K.L. 1993. *Cell and tissue Ultrastructure: A Functional Perspective*. WH Freeman & Co, ZDA
22. Devine P.J., Payne C.M., McCuskey M.K., Hoyer P.B. 2000. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles; *Biol Repr*, 63, 5: 1245-1252
23. Dick E. G., Dick D. A. T., Bradbury S. 1970. The effect of surface microvilli on the water permeability of single toad oocytes. *J Cell Sci*, 6: 451- 476
24. Duellman W.E., Trueb L. 1985. *Biology of amphibians*. New York, McGraw – Hill, Inc., ZDA
25. Dumont J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages in laboratory maintained animals. *J Morphol*, 136: 153-180

26. Durand J., Delay B. 1981. Influence of temperature on the development of *Proteus anguinus* (Caudata: Proteidae) and relation with its habitat in the subterranean world. *Journal of Thermal Biology*, 6, 1: 53–57
27. Eppig, J. J. 1970. Melanogenesis in amphibians II. Electron microscope studies of the normal and PTU-treated pigmented epithelium of developing *Notophthalmus viridescens* eyes. *J Embryol Exp Morphol*, 24: 447-454
28. Fagotto F., Maxfield F. 1994. Yolk platelets in *Xenopus* oocytes maintain an acidic internal pH which may be essential for sodium accumulation. *J Cell Biol*, 125: 1047-1056
29. Franchi L. L. 1960. Electron microscopy of oocyte-follicle cell relationship in the rat ovary. *J Biophys Biochem Cytol*, 7: 397-399
30. Gilbert S.F. 2006. *Developmental biology*. 8th edition. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc., ZDA
31. Green D.P. 1997. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod*, 23:147-156
32. Guraya S.S. 1965. A comparative study of fish (*Channa marulius*) and amphibian (*Bufo somaticus*) oogenesis. *Z Zellforsch Mikrosk. Anat.* 65: 662-700
33. Gülsoy N. 2007. Development of the yolk nucleus of previtellogenic oocytes in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Studied by Light Microscopy. *JABS*, 1, 2: 33-35
34. Han L., Zhang S., Wang Y., Sun X. 2006. Immunohistochemical localization of vitellogenin in the hepatic diverticulum of the amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*, with implications for the origin of the liver. *Invertebrate Biology*, 125, 2: 172-176

35. Jessop T., Sumner J., Lance V., Limpus C., Proc R. 2004. Reproduction in shark-attacked sea turtles is supported by stress-reduction mechanisms. *Proc Biol Sci*, 271, 3: 91-94
36. Juberthie C., Durand P.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*, 23: 53–56.
37. Karasaki S. 1963. Studies on amphibian yolk. I. The ultrastructure of the yolk platelet. *J Cell Biol*, 18, 1: 135-151
38. Kessel R.G., Ganion L.R. 1980. Electron Microscopic and Autoradiographic Studies on. Vitellogenesis in *Necturus maculosus*. *J Morphol*, 164, 3: 215-233
39. Kessel, R.G., Panje W.R. 1968. Organization and activity in pre- and postovulatory follicle of *Necturus maculosus*. *J Cell Biol*, 39: 1-34
40. Kiernan J.A. 1990. Histological and histochemical methods: Theory and practise. 2 edition, Oxford, Pergamon press
41. Kjesbu O.S., Kryvi H. 1989. Oogenesis in cod, *Gadus morhua* L., studied by light and electron-microscopy. *J Fish Biol*, 34, 5: 735-74
42. Landim – Alvarenga F.C., Alvarenga M.A. 2006. Structural aspects of equine oocytes matured in vivo and in vitro. *Braz J Morph Sci*, 23: 513-524
43. Laughran L.J., Larsen J.H., Schroeder P.C. 1981. Ultrastructure of developing ovarian follicles and ovulation in the lizard *Anolis carolinensis* (Reptilia). *Zoomorphology*, 98: 191-208
44. 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

45. Marshall J., Pullen G., Jordan A. 2003. Reproductive biology and sexual maturity of female jack mackerel, *Trachurus declivis* (Jenyns), in eastern Tasmanian waters, Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 44, 6: 799 -809
46. Massover W.H. 1973. Complex surface invaginations in frog oocytes. J Cell Biol, 58, 2: 485-491
47. Matova N., Cooley L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. Dev Biol, 231, 2: [291-320](#)
48. Odor D. L. 1960. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. J Biophys Biochem Cytol, 7: 567-574
49. Özlem C., Sema İ.Ü. 2007. Oocyte Development in the Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 24, 1-2: 137-141
50. Pancharatna M., Saidapur S.K. 1985. Ovarian cycle in the frog *Rana cyanophlyctis*: A quantitative study of follicular kinetics in relation to body mass, oviduct and fat body cycles. J Morphol, 186: 135-147
51. Pätino R., Sullivan C.V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiol Biochem, 26: 57-70
52. Prado C. P. A., Abdalla F. C., Silva A. P. Z., Zina J. 2004. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological consideration. Braz J Morph Sci, 21, 4: 177-184
53. Prisco M., Liguoro A., Ricchiari L., Giudice G., Andreuccetti P. 2007. Oogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 17, 1: 1-10

54. 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
55. 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
56. Selman K., Wallace R.A., Sarka A., Qi X. 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Morphol*, 218, 2: 203-224
57. Sharon R., Degani G., Warburg M.R. 1997. Oogenesis and the ovarian cycle in *Salamandra salamandra atra* Mertens (Amphibia; Urodela; Salamandridae) in fringe areas of the taxon's distribution. *J Morphol*, 231, 2: 149-160
58. Solovei I.V., Joffe B.I., Gaginskaya E.R., Macgregor H.C. 1996. Transcription on lampbrush chromosomes of a centromerically localized highly repeated DNA in pigeon (*Columba*) relates to sequence arrangement. *Chromosome Research*, 4: 588-603
59. Spornitz U.M., Kress A. 1973. Ultrastructural studies of oogenesis in some European amphibians. II. *Triturus vulgaris*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 143: 387-407
60. Srijunngam, J., Kitana N., Callard I.P., Wattanasirmkit, K. 2005. Ultrastructural changes in the ovarian follicular wall during oocyte growth in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* 5, 1: 21-30
61. Srijunngam J., Wattanasirmkit K. 2001. Histological structures of Nile tilapia. *Oreochromis niloticus* Linn. ovary. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*, 1, 1; 53-59

62. Sretarugsa P., Weerachathanukul 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
63. Tabaler I. 2008. Oogeneza pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela, Proteidae). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani
64. Taylor J. D., Hadley M.E. 1972. The fate of amphibian egg melanosomes. J Cell Biol, 52: 493-501
65. Tokarz R. R. 1978. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in non-mammalian vertebrates. In: The vertebrate ovary, comparative biology and evolution. Jones R.E. (ed.). New-York and London, Plenum Press: 145-179
66. Tourte M., Mignotte F., Mounolou J.C. 1981. Organization and replication activity of the mitochondrial mass of oogonia and previtellogenic oocytes in *Xenopus laevis*. Development Growth & Differentiation, 23, 1: 9-21
67. Vazquez-Nin, G. H., Sotello J.R. 1967. Electron microscope study of the atretic oocytes of the rat. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 80: 518-533
68. Villeco E.I., Aybar M.J., Sanchez Riera A.N., Sanchez S.S. 1999. Comparative study of vitellogenesis in the anuran amphibians *Ceratophrys cranweelii* (Leptodactylidae) and *Bufo arenarum* (Bufonidae). Zygote, 7: 11-19
69. Zelazowska 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
70. Wall D.A., Patel S. 1987. Multivesicular bodies play a key role in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. Dev Biol, 119: 275-289

71. Wallace R.A., Misulovin Z., Etkin L.D. 1981. Full-grown oocytes from *Xenopus laevis* resume growth when placed in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 5: 3078-3082
72. Wessel G. M., Brooks J., Green E., Haley S., Voronina E., Wong J., Zaydfudim V., Conner S.D. 2001. The Biology of Cortical Granules. In: International Review of Cytology. Jeon K.W. (ed.). Academic Press, 209: 117-206
73. Wilk K., Bilinski S., Dougherty M.T., Kloc M. 2005. Delivery of germinal granules and localized RNAs via the messenger transport organizer pathway to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes occurs through directional expansion of the mitochondrial cloud. *Int J Dev Biol*, 49, 1: 17-21
74. Wischnitzer S. 1964. An electron microscopic study of the formation of the zona pellucida in the oocytes from *Triturus viridescens*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 64: 196-209

7.2 ELEKTRONSKI VIRI

1. Hyllner S.J., Haux C. 1994. Vitelline envelope proteins in teleost fish. http://nsgl.gso.uri.edu/tamu/tamuw95002/tamuw95002_part8.pdf, 7.12.09