

UNIVERZA V LJUBLJANI
PEDAGOŠKA FAKULTETA

ŠPELA VELŠE

OCENA PRISOTNOSTI PIGMENTNIH
SKUPKOV V JAJČNIKI MOČERILA

DIPLOMSKO DELO

LJUBLJANA, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
PEDAGOŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJSKI PROGRAM: KEMIJA IN
BIOLOGIJA

ŠPELA VELŠE

MENTORICA: DOC. DR. LILIJANA BIZJAK MALI

OCENA PRISOTNOSTI PIGMENTNIH
SKUPKOV V JAJČNIKI MOČERILA

DIPLOMSKO DELO

LJUBLJANA, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije in kemije. Opravljeno je bilo na katedri za zoologijo, v skupini za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Pedagoške fakultete je potrdila temo in naslov diplomskega dela, ter za mentorico imenovala doc. dr. Lilijano Bizjak Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Boris Bulog

Član: doc. dr. Lilijana Bizjak Mali

Član: asist. dr. Nada Žnidaršič

Datum zagovora: 12.9.2014

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Pedagoške fakultete.

Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Špela Velše

KLJUČNA DOKUMENTACIJA (KDI)

ŠD Du1

DK 597.92(043.2)=163.6

KG jajčnik / pigmentni skupki / atrezije / stradanje / jamska dvoživka / *Proteus anguinus anguinus*

AV VELŠE, Špela

SA BIZJAK MALI, Lilijana

KZ SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16

ZA Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta

LI 2014

IN TD Diplomaska naloga

IJ sl/en

Namen naloge je bil oceniti prisotnost pigmentnih skupkov v različno zrelih jajčnikih bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). S stereolupo smo pregledali histološke rezine jajčnikov petih samic iz narave ter šestih samic, ki so bile stradane krajše (N=3) in daljše obdobje (N=3). Ker so bili jajčniki različno veliki smo primerjali povprečja pigmentnih skupkov na histološko rezino. Ugotavljamo, da so pigmentni skupki zastopani v jajčnikih, v katerih so sočasno tudi atretični folikli ter da so številčnejši v jajčnikih samic stradanih daljše časovno obdobje.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du1

DC 597.92(043.2)=163.6

CX ovary / pigment clusters / atresia / starvation / cave amphibian / *Proteus anguinus anguinus*

AU VELŠE, Špela

AA BIZJAK MALI, Lilijana

PP SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16

PB University of Ljubljana, Faculty of Education

PY 2014

TI The estimation of the presence of pigment clusters in the ovaries of the Proteus.

DT Graduation thesis

LA sl/en

The purpose of this work was to evaluate the presence of pigment clusters in different mature ovaries of white subspecies of the cave salamander (*Proteus anguinus anguinus*). Histological slices of ovaries of five females from the wild, and six females which starved for a shorter (N=3) and a longer period (N=3) were examined with the stereomicroscope. The average of pigment clusters in histological slice was calculated in order to compare the results between specimens. We found out that the pigment clusters are present in the ovaries, which contain atresia at the same time and that more pigment clusters are in ovaries of females that are starved for a longer period of time.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojim staršema, Anici in Dušanu, ki sta mi omogočila študij, za njuno zaupanje, razumevanje, moralno in finančno podporo, sestri Brigitti za spodbujanje, svetovanje in podporo.

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici, doc. dr. Lilijani Bizjak Mali, za svetovanje in vodenje pri pisanju diplomske naloge ter za razumevanje in potrpežljivost.

Kazalo vsebine

1. UVOD.....	1
2. TEORETIČNA IZHODIŠČA	3
2.2. Močeril (<i>Proteus anguinus</i> , Laurenti, 1768)	3
2.3. Jajčnik močerila	4
2.4. Atrezije v jajčniku močerila.....	6
2.5. Pigmentni skupki ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema	7
3. MATERIAL IN METODE	11
3.2. Material.....	11
3.3. 3.2. Metode	12
4. REZULTATI.....	13
5. DISKUSIJA IN SKLEPI.....	17
6. LITERATURA.....	20

Kazalo slik in preglednic

Slika 1: Jajčnik močerila. I – IV: zoritvene faze oocitov. Posnetek s stereolupo.(Žibert, 2010).....	4
Slika 2. Jajčnik močerila (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) z atrezijami. Histološka rezina, H&E barvanje (Habič, 2012).....	7
Slika 3: Pigmentni skupki v jajčniku močerila (<i>Proteus anguinus anguinus</i>). Histološka rezina, barvanje H&E.	13
Slika 4: Primerjava prisotnosti pigmentnih skupkov v jajčnikih samic iz narave in pri stradanih samicah. <i>Legenda: modra barva, samice iz narave; zelena barva, samice stradane ene do štiri mesece; rdeča barva, samice stradane štirinajst do osemnajst mesecev.</i>	15
Slika 5: Povprečno število pigmentnih skupkov in zrelostne faze oocitov v jajčnikih močerila.	16
Preglednica 1: Podatki o poskusnih živalih.....	12

Preglednica 2: Podatki o pigmentnih skupkih (PS) in atrezijah v jajčnikih močerila
(*Proteus anguinus anguinus*) ter zrelostnih fazah oocitov. Podana je tudi
dolžina telesa in masa osebka14

1. UVOD

Raziskave morfologije jajčnika bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*), neotenične jamske dvoživke, so razkrile prisotnost degenerirajočih jajčnih foliklov ali atrezij (Talaber, 2008; Bizjak Mali in Bulog, 2011; Habič, 2012). Atrezije so široko razširjen degenerativen proces v jajčnikih vretenčarjev in nevretenčarjev. Pri tem oociti, ki so lahko v različnih stadijih razvoja in rasti, propadejo še pred ovulacijo (Guraya, 1989). Pravzaprav gre za specifičen fiziološki intraovarijski način prebave degenerirajočega oocita s strani celic folikla, ki proliferirajo, hipertrofirajo in postanejo fagocitotone (Ogielska, Rozenblut, Augustynska in Kotusz, 2010). Atrezije so pogoste pri osebkih, ki so izpostavljeni stresnim dejavnikom, na primer stradanju (Ogielska idr., 2010; v Habič, 2012).

Za jajčnike močerila so opisane tri stopnje degeneracije folikla: zgodnja, vmesna in napredna stopnja (Bizjak Mali in Bulog, 2011; Habič, 2012). Oociti, ki degenerirajo so v vitelogeni fazi zoritve. Za zgodnjo stopnjo degeneracije je značilna spremenjena citoplazma oocita, folikularne celice pa so pomnožene in povečane. Te vdirajo v citoplazmo in fagocitirajo notranjost oocita. Na vmesni stopnji degeneracije je citoplazma že fagocitirana, folikel pa je zapolnjen s fagocitnimi celicami folikla. Z napredovanjem degeneracije se večja pigmentiranost folikla, njegova velikost pa se manjša vsled postopnega zmanjševanja števila celic folikla. Predvideva se, da so pigmentni skupki v vezivni steni jajčnikov močerila rezidualni ostanek atrezij (Habič, 2012), kar navajajo tudi za jajčnike brezrepcev (Ogielska idr., 2010). Kondenzirani skupki celic s temnim pigmentom se v jajčnikih brezrepcev pojavijo ob zaključku atrezij. Pigmentni skupki v steni jajčnika močerila so lahko tudi del ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema, ki je zastopan v večini mehkih tkiv poikilotermnih vretenčarjev (Habič, 2012). Pravzaprav so lahko neke vrste melanomakrofagi, ki v jajčniku močerila vršijo fagocitozo in akumulacijo nastalih produktov v procesu degeneracije jajčnih foliklov.

Namen naloge je oceniti prisotnost pigmentnih skupkov v različno zrelih jajčnikih močerila ter v jajčnikih samic iz narave in stradanih samic.

Naši dve hipotezi sta bili, da so pigmentni skupki le v jajčnikih, ki vključujejo atrezije ter da so številčnejši pri stradanih samicah.

2. TEORETIČNA IZHODIŠČA

2.2. Močeril (*Proteus anguinus*, Laurenti, 1768)

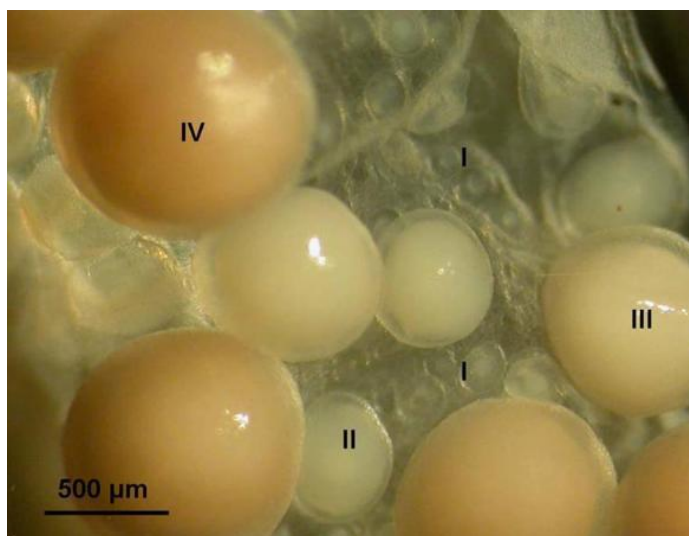
Močeril ali človeška ribica je neotenična jamska dvoživka, ki živi v podzemnih vodah Dinarskega krasa, in sicer od reke Soče v Italiji na severozahodu do reke Trebišnjice v Hercegovini na jugovzhodu. Poznanih je 250 nahajališč, od tega jih je največ v Sloveniji (Sket, 1997). Je največja jamska žival na svetu ter edini jamski vretenčar v Evropi. Je troglomorfen (ima zunanjo podobo jamskih živali): koža je skoraj brez pigmenta, oči so reducirane in vgreznjene globoko pod kožo, gobec je podaljšan in prisekan. Tudi biološko je prilagojen na podzemlje: potreba po prehrani je majhna, presnova upočasnjena, osebni razvoj počasen, število potomcev pa majhno. Celo telo je občutljivo na svetlobo, voh in okus sta dobro razvita, specifično je razvito notranje oko, posebnost pa so čutila za električno polje. Močeril diha z zunanjimi škrgami, ki so živo rdeče barve zaradi krvi, ki proseva skozi steno. Ima tudi preprosta pljuča, ki služijo predvsem kot pomemben hidrostatski organ. Njihova respiratorna vloga je sekundarna. Spola se po zunanosti le malo razlikujeta, samec se od samice loči le po nekoliko debelejši kloaki. Močeril spolno dozori pri štirinajstih letih. Samica izleže med skale do 70 jajc, ki merijo v premer 12 mm. Ko se ličinke izležejo, merijo okoli 2 cm in še dober mesec po tem živijo od rumenjaka, ki je shranjen v celicah črevesne stene. Po štirih mesecih postanejo ličinke po obliki podobne odraslim živalim. Za močerila je značilen pojav pedomorfnost, kar pomeni, da ne pride do preobrazbe ampak žival spolno dozori in vse življenje ohrani nekatere juvenilne znake ličinke. Življenjsko dobo človeške ribice v naravnem okolju ocenjujejo na okoli 58 let. Osebk v ujetništvu pa so živeli tudi po 70 let (Wikipedia, 2014).

2.3. Jajčnik močerila

V jajčnikih vretenčarjev, poteka i) proces oogeneze ali zorenje spolnih celic; ii) ovulacija, sprostitve zrelih jajčnih celic v jajcevod; in iii) izločanje ženskih spolnih hormonov (Uribe Aranzabal, 2003).

Pri močerilu (*Proteus anguinus anguinus*) je jajčnik podolgovate oblike in je votlega tipa, kar se tudi sklada z obliko telesa živali (Talaber, 2008). V njem so sočasno različne zoritvene faze jajčnih celic ali oocitov, kar pomeni, da je to asinhroni tip jajčnika (Bizjak Mali idr., 2010).

Opisanih je pet zoritvenih faz oocitov na osnovi zunanje morfologije, velikosti, barve histoloških in ultrastrukturnih značilnosti, in sicer dve previtelogeni fazi (OI in OII) in tri vitelogene (OIII, OIV in OV) (sl. 1) (Talaber, 2008; Bizjak Mali idr., 2010; Žibert, 2010). V nadaljevanju povzemamo glavne značilnosti.



Slika 1: Jajčnik močerila. I – IV: zoritvene faze oocitov. Posnetek s stereolupo. (Žibert, 2010).

Najmanjše jajčne celice v jajčniku so oogoniji (od 20 do 50 μm). Citoplazme je malo, jedro je veliko, jedrca pa maloštevilna. Pogosto so v skupkih v robnem delu vezivne stene

jajčnika. Prisotnost oogonijev v jajčnikih odraslih samic izkazuje sposobnost nastajanja novih generacij oocitov tudi v odraslem obdobju (Bizjak Mali idr., 2013).

Previtelogeni oociti I in II so najštevilčnejša populacija celic v jajčniku močerila in so konstantna zaloga za rast (Bizjak Mali idr., 2013). Oociti I merijo od 100 do 300 μm . Zanje je značilna prosojna citoplazma in homogena jedrna masa, jedro je veliko s številnimi jedrci. Oociti II so večji in merijo med 300 in 600 μm . Povečano je število jedrc na jedrni periferiji. Ureditev citoplazme je podobna tisti v oocitu I.

Oociti III merijo od 600 do 1000 μm in so bele do rumenkasto mlečne barve. So že vitelogeni oociti, saj v njih poteka proces privzema rumenjakovih proteinov v citoplazmo oocita, kar je razvidno iz ultrastrukturnih značilnosti (Bizjak Mali idr., 2010). Rumenjakeve ploščice se v tej fazi zoritve še ne oblikujejo. Oociti IV so večji in enakomerno rjavo pigmentirani (1000 do 1700 μm). V njih se že kopičijo rumenjakeve ploščice, ki so pomembne za rast in razvoj embria, saj predstavljajo zalogo aminokislin, ogljikovih hidratov, lipidov, fosfatov in ionov (v Žibert, 2010). Žibert (2010) je IV. zoritveno fazo oocitov razdelila na zgodnjo in pozno, saj se količina rumenjakovih ploščic postopoma povečuje, različna pa je tudi njihova razporeditev.

Najstarejša zabeležena faza jajčnih celic v jajčniku močerila so oociti V, ki pa najverjetneje še niso končna faza oogeneze (Žibert, 2010). Njihova citoplazma je zapolnjena z rumenjakovimi ploščicami, jedro pa je izrinjeno na periferijo.

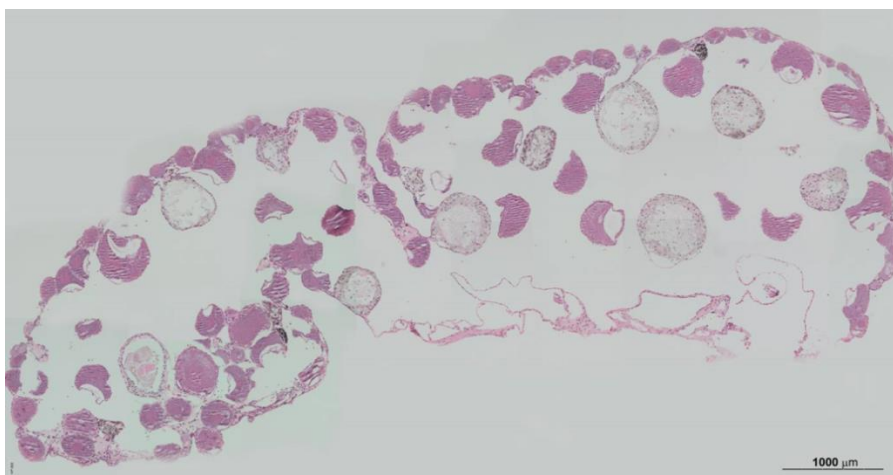
Mitotske delitve oogonijev in zrele vitelogene celice so v jajčnikih močerila, neodvisno od letnih časov, kar kaže na to, da samice lahko izležejo jajca v vsakem obdobju leta (Bizjak Mali idr., 2013).

2.4. Atrezije v jajčniku močerila

Degeneracija oocitov znotraj jajčnih foliklov, je pri jajčnikih vretenčarjev znana že zelo dolgo časa. Proces pri katerem so oociti izločeni pred ovulacijo, se pogosto imenuje znotraj folikularna atrezija. Degeneracija zarodnih celic pri sesalcih je razdeljena na dve fazi (v Ogielska idr., 2010). Na zgodnjo fazo, ki se imenuje slabljenje, poteka pred rojstvom in vpliva le na zarodne celice pred folikulogenezo. Pozna faza, pri kateri degeneracija folikularnih celic povzroča smrt jajčnih celic, se imenuje atrezija, ki se pojavi med puberteto in v menopavzi. Nedavne raziskave so razkrile, da je degeneracija foliklov pravzaprav rezultat programirane celične smrti, v glavnem apoptoze (v Ogielska idr., 2010). Apoptoza je genetsko reguliran proces, nujen za vzdrževanje homeostaze tkiv v vseh mnogoceličnih organizmih, pri katerem gredo vse v nadaljnjih fazah nerabljene celice v proces samouničenja (v Habič, 2012).

Uribe Aranzabal (2003) pravi, da se atrezije pri vretenčarjih pojavljajo v različnih fazah razvoja jajčnih celic. Med tem procesom folikularne degeneracije, celice folikla hipertrofirajo in fagocitirajo jajčno celico. Degenerirajoče jajčne celice imajo na periferiji votlinice, rumenjaki in pigmentna zrna, ki tvorijo skupke, vitelinska ovojnica jajčne celice postane prekinjena in razpršena. V pozni fazi atrezije, hipertrofirane celice folikla prebavijo in odstranijo oocite z rumenjaki, za seboj pa pustijo maso pigmenta obdano s hipertrofirano vezivno teko. Končna masa pigmenta pa pri repatih dvoživkah sčasoma izgine (Lofts 1984 v Uribe Aranzabal, 2003; Chieffi in Perantoni 1987 v Uribe Aranzabal, 2003). Atrezije pri dvoživkah so pogoste pri osebkih, ki so izpostavljeni stresnim dejavnikom, na primer stradanju (Ogielska idr., 2010; v Habič, 2012).

Pri močerilu so atrezije predvsem v jajčnikih z vitelogenimi oociti, in so pogostejše pri osebkih, ki jim je bila odvzeta hrana (Habič, 2012). Resorbcija rumenjaka s strani fagocitnih folikularnih celic je lahko bistvenega pomena za normalen razvoj in zorenje preostalih oocitov v jajčnikih in s tem zagotavljanje reprodukcijskega potenciala vrste, saj gre lahko za recikliranje energijsko bogatih substanc rumenjaka (Bizjak Mali idr., 2013).



Slika 2. Jajčnik močerila (*Proteus anguinus anguinus*) z atrezijami. Histološka rezina, H&E barvanje (Habič, 2012)

Habič (2012) pravi, da so atretični folikli v jajčnikih močerila okroglih do nepravilnih oblik in različnih velikosti, s premerom od 300 do 1000 μm . Od oocitov se razlikujejo po marmoriranem izgledu, nekateri so lahko tudi popolnoma temni, rjavo-črni. Atrezije v jajčniku močerila ustrezajo tipu I, ki ga opisuje tudi Ogielska idr. (2010) za jajčnike brezrepcev,, za katerega je značilno, da folikularne celice proliferirajo, hipertrofirajo, postanejo fagocitotne ter prebavijo vitelogeni oocit.

Ogielska in sodelavci (2010) navajajo še dva tipa atrezij (tip II in III) v jajčnikih brezrepcev, ki jih pri močerilu niso zasledili (Habič, 2012). V jajčnikih močerila niso našli razpada folikla in razpršitve citoplazme oocita, kot je značilno za atrezije tipa II pri brezrepkih, niti niso opazili atrezij tipa III, pri katerih folikularne celice ne vdrejo v citoplazmo oocita.

2.5. Pigmentni skupki ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema

Pigmentne celice pri vretenčarjih z nestalno telesno temperaturo niso omejene samo na kožo, ampak so prisotne tudi v notranjih organih, kot so jetra, ledvica, vranica, srce, gonade, priželjce, peritonej ter okoli krvnih žil, in tvorijo ekstrakutaneusni pigmentni sistem (v Prelovšek, 2002). V jetrih dvoživk so interpretirane kot rezidenčne jetrne makrofagne celice, znane kot Kupfferjeve celice ali celice, ki izhajajo iz ali so skupnega izvora z

Kupfferjevimi celicami (v Prelovšek, 2002). V jetrih močerila so obsežni pigmentni skupki, ki so sestavljeni iz večjega števila pigmentnih celic. Analize so pokazale, da so v teh skupkih trije tipi pigmentnih celic, ki vsebujejo melanin, haemosiderin in lipofuscin (Prelovšek, 2002). Količina specifičnega pigmenta je različna med vrstami. Pri beli podvrsti močerila pigmentne celice v jetrih vsebujejo predvsem haemosiderin in majhno količino melanina (Prelovšek, Bizjak Mali in Bulog, 2008). V nekaterih pigmentnih celicah pa poteka tudi melanosinteza.

Raziskave morfologije jajčnika močerila so razkrile prisotnost pigmentnih celic v vezivni steni jajčnikov (Talaber, 2008; Žibert, 2010). Histokemijsko Masson-Fontana barvanje jajčnikov močerila je potrdilo prisotnost melanina (Habič, 2012). Predvideva se, da so pigmentne celice v jajčniku močerila najverjetneje rezidualni ostanek atrezij (Habič, 2012), kar opisujejo tudi za jajčnike brezrepcev (Ogielska idr., 2010).

Melanomakrofagni centri, znani tudi kot makrofagni agregati v tkivih vretenčarjev z nestalno telesno temperaturo, so značilni skupki celic, ki vsebujejo pigment in so sposobni melanosinteze (Agius in Roberts, 2003). Pri dvoživkah pa so predvsem v jetrih. Lahko pa se razvijejo kot lezije drugje v telesu zaradi kroničnega vnetja, prav tako lahko nastajajo med atrezijo jajčnika (Agius in Roberts, 2003).

Morfološki videz melanomakrofagnih centrov se lahko razlikuje pri različnih vrstah, v različnih organih in tudi pri različnih fizioloških pogojih znotraj iste živalske vrste, kot so npr. starost, stradanje, poškodba tkiva, količina železa in hemoglobina (Agius in Roberts, 2003). Zabeleženi so tudi podatki o spremembah v velikosti in kapaciteti makrofagov, ki so jih povzročile spremembe v okolju (Kranz in Gercken 1987; Fournie idr. 2001 v Agius in Roberts, 2003), kot na primer onesnaženje vode, vnos tujerodnih vrst, neka sprememba, ki se pojavi na novo in lahko povzroči stres pri živali.

Melanomakrofagni centri ponavadi vsebujejo različne pigmente, vključno z melaninom. Sinteza melanina v makrofagih, je lahko posledični odgovor na potencialno nevarno železo, ki je sočasno zastopano v teh celicah (Henninger in Beresford, 1990). Funkcij, ki jih pripisujejo melanomakrofagnim centrom, je veliko, vključno s skladiščenjem fosfolipidov in železa pridobljenega po eritrofagocitozi (Agius 1979, 1981; Agius in

Agbede 1984, v Agius in Roberts, 2003) ter odlaganje odpornih patogenov, bakterijskih in parazitskih spor (Roberts 1975, v Agius in Roberts, 2003) in antigenov imunskega odziva (Agius 1985, v Agius in Roberts, 2003).

Številne študije kažejo, da je splošna funkcija melanomakrofagih centrov uničenje, razstrupljanje ali recikliranje endogenih in eksogenih materialov (Ferguson 1976; Ellis 1980; Herraezin Zapata 1986, v Agius in Roberts, 2003). Ena izmed ključnih funkcij pa je njihova presnovna vloga, in sicer so odlagališče poškodovanih celic, vključno z rdečimi krvnimi celicami. Pri ribah so opazili, da se velikost centrov in njihovo število povečuje s starostjo in z degeneracijo tkiva (Agius 1981; Brown in George 1985, v Agius in Roberts, 2003). Melanomakrofagni centri igrajo tudi pomembno vlogo pri odzivu na tuje snovi. Ribe, ki naseljujejo onesnaženo okolje, lahko to degradacijo okolja odražajo preko spremenjene aktivnosti imunskega sistema ali nespecifične obrambe. Do sprememb v velikosti in številu melanomakrofagih centrov lahko pride zaradi fizioloških vplivov, lahko pa na to vplivajo onesnažila. Številni avtorji so mnenja, da so lahko melanomakrofagni centri dober pokazatelj stresnih razmer v vodnem okolju, saj so vpleteni v različne bolezenske procese in spremembe, ki jih povzročajo dejavniki, kot so stradanje ali izpostavljenost kemikalijam (Agius in Roberts, 2003).

2.5.1. Melanin

Melanin, nastaja v melanocitih, ki so izvorno iz celic nevrálnega grebena. Dolgo se je predvidevalo, da melanomakrofagi centri v mehkih tkivih vretenčarjev niso sposobni proizvajati melanin. Agbede in Agius (1984, v Agius in Roberts, 2003) sta predvidevala, da je melanin znotraj melanomakrofagih centrov izredno podoben tistemu v koži ter da verjetno izvira iz fagocitoze melanosomov. Vendar pa to ni nujno. Na brancinu in drugih morskih vrstah rib so dokazali, da se dejansko lahko melanin sintetizira v melanomakrofagih (Agius in Roberts, 2003). Sintezo melanina so potrdili v pigmentnih celicah v jetrih žabe *Rana esculenta* Gallone idr.(2002, v Agius in Roberts, 2003), prav tako je melanosinteza potrjena za pigmentne celice v jetrih močerila (Prelovšek, 2003).

Melanin je sestavljen iz zapletenih polimerov, ki lahko absorbirajo in nevtralizirajo proste radikale, katione in druge potencialno toksične snovi, ki izhajajo iz razgradnje od fagocitiranega celičnega materiala (v Agius in Roberts, 2003). Pomembna vloga polimera znotraj makrofaga je nevtralizirati proste radikale, ki so sproščeni kot posledica katabolizma maščobnih kislin, pridobljenih iz fagocitoze celičnih membran pri nizkih temperaturah (cit. v Agius in Roberts, 2003). Wolke s sod. (1985) je bila mnenja, da ima morda melanin pomembno vlogo pri proizvodnji baktericidnih spojin, še posebej vodikovega peroksida, da njihovi kinonski predhodniki delujejo bakteriocidno, kar je še posebej pomembno pri ektotermnih vretenčarjih, saj je pri nizkih temperaturah aktivnost encimov omejena (v Agius in Roberts, 2003).

3. MATERIAL IN METODE

3.2. Material

Pregledali smo histološke rezine jajčnikov enajstih samic bele podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus*. V raziskavo smo vključili samo jajčnike, ki so bili zrezani v celoti. Na istih osebkih je že bila narejena morfologija jajčnika (Žibert, 2010) in morfologija atrezij (Habič, 2012).

Vzorci jajčnikov so iz arhivske zbirke tkiv skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Osebki so bili žrtvovani v predhodnih letih za različne raziskovalne namene in z dovoljenjem Agencije RS Slovenije za okolje ter Ministrstva za okolje, prostor in energijo.

Osebki v našem vzorcu so bile spolno zrele samice, s telesno dolžino od 220 mm do 290 mm in telesno težo od 11,4 g do 33,4 g (Preglednica 1). Jajčniki so vključevali različne zrelostne faze oocitov. Zrelost jajčnikov je podana v preglednici 1. in je povzeta po Žibert (2010). Osem osebkov je bilo ujetih v Planinski jami, dva v Otoškem bregu in eden v Grčavskih ravneh. Vse živali so bile do žrtvovanja vzdrževane v speleobiološkem laboratoriju na Oddelku za Biologijo Biotehniške fakultete, v akvarijih z vodnimi filtrirnimi črpalkami, pri temperaturi 10 °C in v stalni temi.

Šest osebkov je bilo v poskusu stradanja, od tega so bili trije (P132, P137 in P171) stradani odenega do štirih mesecev, in trije (P147, P176, P177) štirinajst do osemnajst mesecev (Preglednica 1).

Preglednica 1: Podatki o poskusnih živalih.

Evidenčna številka	Datum	Letni čas	Lokaliteta	Dolžina telesa (mm)	Masa osebka (g)	Zrelost ovarija			
						OII	OIII	OIV	OV
Hranjeni osebki									
P131	15.12.1998	zima	Planinska jama	250	/			+	
P151	27.10.2000	jesen	Otoški breg	240	15,5	+			
P157	15.11.2001	jesen	Otoški breg	285	33,4			+	
P168	26.11.2003	jesen	Planinska jama	257	21,69	+			
P181	6.12.2005	zima	Grčarske ravne	223	13,33	+			
Stradani 1 do 4 mesece									
P132	21.1.1999	zima	Planinska jama	226	17,0			+	
P137	14.4.1999	pomlad	Planinska jama	222	/			+	
P171	1.12.2004	zima	Planinska jama	235	16,44		+		
Stradani 14 do 18 mesecev									
P147	12.4.2000	pomlad	Planinska jama	270	18,8			+	
P176	28.1.2005	zima	Planinska jama	243	15,3		+		
P177	19.5.2005	pomlad	Planinska jama	250	11,4	+			

Opomba: Zoritvene faze oocitov so povzete po Žibert (2010).

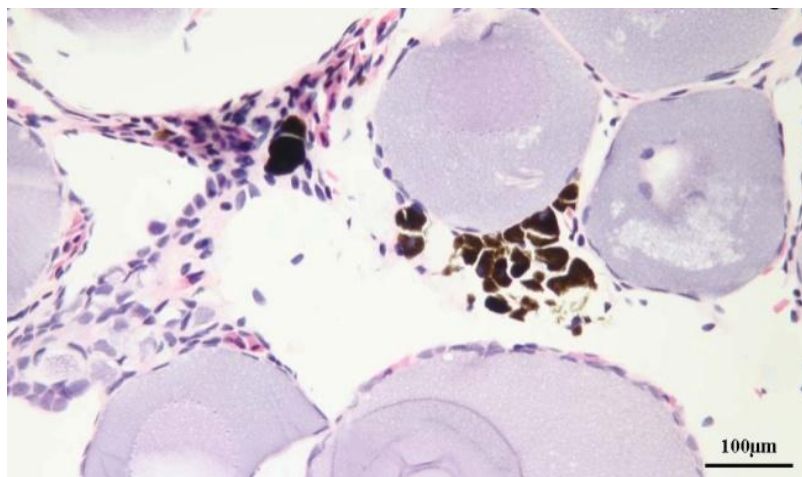
3.3.3.2. Metode

S stereolupo *Leica MZFLIII*, smo pregledali histološke rezine jajčnikov bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in prešteli število pigmentnih skupkov na vsaki posamezni histološki rezini celotnega jajčnika. Jajčniki so bili rezani vzdolžno. Število rezin za vsak posamezni jajčnik je bilo različno, saj so bili jajčniki različno veliki. Vsoto vseh prešteti pigmentnih skupkov za posamezen jajčnik smo delili s številom vseh rezin jajčnika in dobili povprečno število pigmentnih skupkov na rezino, ki jih podajamo v rezultatih (Preglednica 2).

4. REZULTATI

Pigmentni skupki so v vezivu jajčnika med oociti (sl. 2). Skupki so običajno iz večjega števila celic, ki vključujejo temno, rjavo do črno obarvana zrna.

Večina jajčnikov v našem vzorcu je vključevala tudi pigmentne celice. Od enajstih pregledanih jajčnikov, samo v enem primeru pigmentnih skupkov nismo našli (Preglednica 2). Število pigmentni skupkov v jajčnikih samic je raznoliko, v nekaterih jajčnikih jih je zelo veliko, pri drugih pa smo jih komaj zasledili.



Slika 3: Pigmentni skupki v jajčniku močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Histološka rezina, barvanje H&E.

4.1. Pigmentni skupki v jajčnikih samic iz narave in stradanih samicah

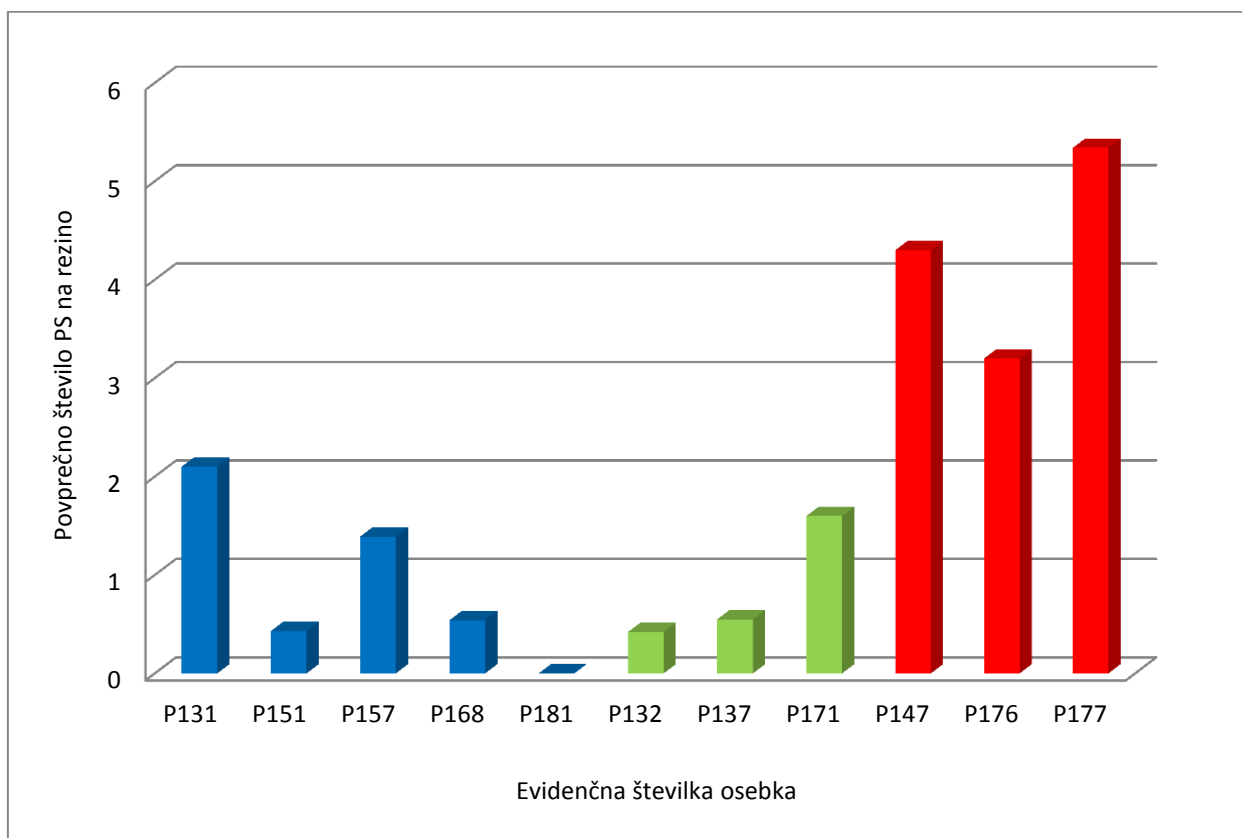
V vzorcu smo imeli jajčnike samic iz narave (N=5), samic stradanih ena do štiri mesece (N=3) in samic stradanih štirinajst do osemnajst mesecev (N=3) (Preglednica 2). Pigmentne skupke smo šteli na histoloških rezinah celotnega zrezanega jajčnika. V preglednici 2 podajamo povprečje pigmentnih skupkov na rezino, saj so bili jajčniki različno veliki in s tem tudi število rezin.

Največ pigmentnih skupkov v jajčnikih so imele samice stradale od štirinajst do osemnajst mesecev, povprečno število pigmentnih celic na rezino je $4,28 \pm 0,87$ (min. 3,2, max. 5,34) (Preglednica 2). Pri samicah iz narave je povprečno število pigmentnih skupkov bistveno nižje, in sicer $0,89 \pm 0,75$ (min. 0,43, max. 2,1), v jajčnikih samic, ki so bile stradale od enega do štirih mesecev pa je povprečno število pigmentnih skupkov $0,86 \pm 0,53$ (min. 0,42, max. 1,6).

Preglednica 2: Podatki o pigmentnih skupkih (PS) in atrezijah v jajčnikih močerila (*Proteus anguinus anguinus*) ter zrelostnih fazah oocitov. Podana je tudi dolžina telesa in masa osebka.

Evidenčna številka osebka	Povprečno število PS na rezino	Dolžina telesa (mm)	Masa osebka (g)	Zrelostna faza oocita	Atrezije da ali ne
Kontrola					
P181	0	223	13,33	OII	Ne
P151	0,43	240	15,5	OII	Da*
P168	0,54	257	21,69	OII	Da
P157	1,39	285	33,4	OIV	Da
P131	2,1	250	ni podatka	OIV	Da
Stradani 1 do 4 mesece					
P132	0,42	226	17,0	OIV	Ne
P137	0,55	222	ni podatka	OIV	Da
P171	1,6	235	16,44	OIII	Da
Stradani 14 do 18 mesecev					
P176	3,2	243	15,3	OIII	Da
P147	4,3	270	18,8	OIV	Da
P177	5,34	250	11,4	OII	Da*

Legenda: Da, v jajčniku ni tipičnih atrezij pač pa foliklom podobne strukture vezivnega značaja, najverjetneje gre za drugačen tip propada folikla (Habič, 2012).*

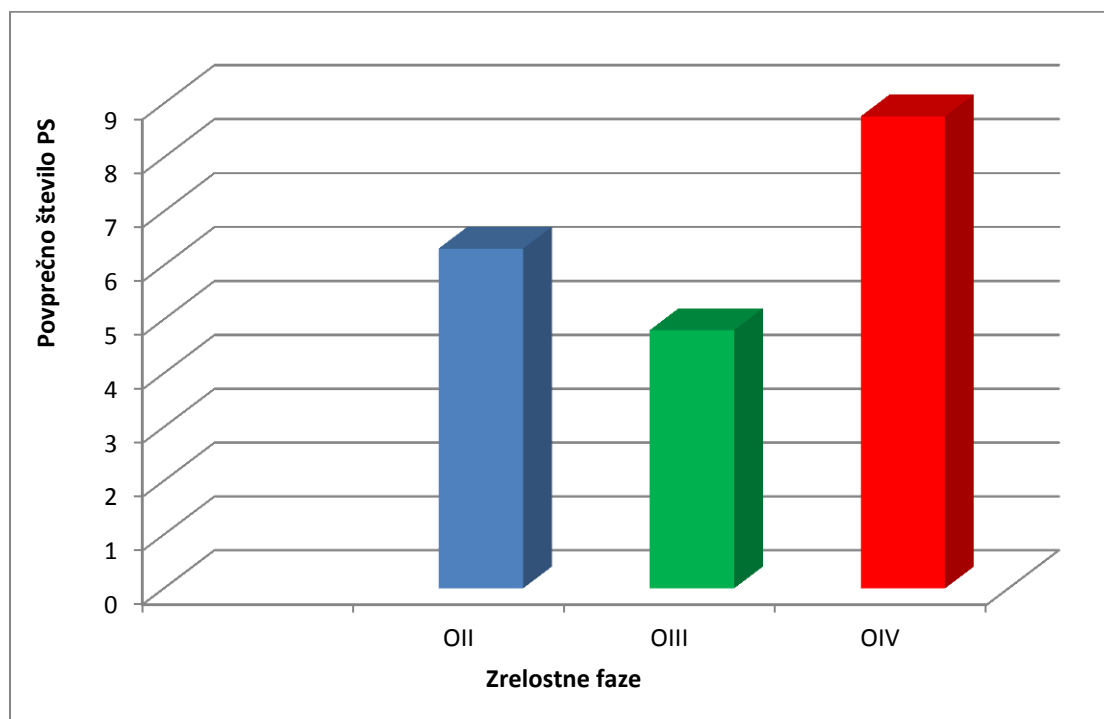


Slika 4: Primerjava prisotnosti pigmentnih skupkov v jajčnikih samic iz narave in pri stradanih samicah.

Legenda: modra barva, samice iz narave; zelena barva, samice stradane ene do štiri mesece; rdeča barva, samice stradane štirinajst do osemnajst mesecev.

4.2. Pigmentni skupki in zoritvene faze oocitov

Jajčniki samic v našem vzorcu so vključevali različne zrelostne faze oocitov, bodisi samo previtelogene oocite ali pa tudi vitelogene (Preglednica 2). Vse samice, razen ene (P181), so v jajčnikih imele tudi pigmentne skupke. Največ pigmentnih skupkov je imela samica (P177), ki je bila stradana daljše obdobje, jajčnik pa je vključeval previtelogeno fazo oocitov (OII). Povprečno število pigmentnih skupkov na rezino je 5,34. Najmanj pigmentnih skupkov smo prešteli pri samici P132, ki je bila stradana krajše obdobje, v jajčniku pa so bili vitelogeni oociti IV. zoritvene faze. Povprečno število pigmentnih skupkov na rezino je bilo pri njej 0,42 (Slika 4).



Slika 5: Povprečno število pigmentnih skupkov in zrelostne faze oocitov v jajčnikih močerila.

Iz slike 5 lahko vidimo, da je največ pigmentnih skupkov v jajčnikih samic, ki so imele oocite v IV. zrelostni fazi, najmanj pa jih je bilo v jajčnikih z III. zrelostno fazo oocitov (OIII).

4.3. Pigmentni skupki in atrezije

V jajčnikih devetih samic od enajstih so prisotne atrezije in v vseh devetih jajčnikih so tudi pigmentni skupki (Preglednica 2). Jajčnik osebk P132 atrezij ni imel, vendar pa so v jajčniku pigmentni skupki. Osebek P181 pa ni imel ne pigmentnih skupkov niti atrezij.

5. DISKUSIJA IN SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo pregledali histološke rezine jajčnikov enajstih samic bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Šest samic je bilo stradanih, od tega so bile tri samice stradane ena do štiri mesece in tri samice od štirinajst do osemnajst mesecev. Naši dve hipotezi sta bili, da so pigmentni skupki le v jajčnikih, ki vključujejo atrezije ter da so številčnejši pri stradanih samicah.

Jajčniki devetih samic od enajstih so imeli sočasno atrezije in tudi pigmentne skupke. Našo postavljeno hipotezo, da bodo pigmentni skupki le v jajčnikih, ki vključujejo atrezije, lahko potrdimo. Hipotezo smo postavili na podlagi domneve Habičeve (2012), da so pigmentni skupki rezidualni preostanek atrezij, kajti z napredovanjem procesa degeneracije se pigmentiranost celic atretičnega folikla stopnjuje, velikost atrezije pa se postopno zmanjšuje.

Pigmentne skupke smo našli tudi v jajčniku samice (P132), ki atrezij ni imela. V tem primeru bi prisotnost pigmentnih skupkov v jajčniku lahko razložili z: i) napako pri oceni zastopanosti atrezij, saj je atrezije težje prepoznati, in ii) propad jajčnih foliklov je dinamičen proces in se je pri omenjeni samici najverjetneje zaključil, še predno je bila le-ta žrtvovana, pigmentni skupki v jajčniku pa so lahko tako preostanek propadov. Pigmentirane večcelične strukture v jajčniku rib nastanejo iz atretičnih teles in ostanejo v jajčniku vsaj do naslednjega drstenja (Linares-Casenave idr., 2002 v Habič, 2012).

Nekateri avtorji menijo, da pigmentni skupki v jajčniku dvoživk sčasoma izginejo, drugi pa da ostajajo in se njihovo število s starostjo povečuje (v Ogielska idr., 2010). Dinamika pigmentnih skupkov v jajčnikih odraslih osebkov pri močerilu ni poznana. Zanimivo bi bilo preučiti jajčnike različno starih osebkov in ugotoviti, če se število pigmentnih skupkov v jajčniku močerila s starostjo povečuje. Predvidena je analiza na jajčnikih samic močerila poznane starosti iz arhivske zbirke jamskega laboratoriju v Moulisu (Francija), kjer so bili osebki izleženi in gojeni.

Ugotovljeno je bilo, da so v jajčniku močerila atrezijam podvrženi le vitelogeni oociti (OIII in OIV) (Habič, 2012), kar je značilno tudi za večino oviparnih vretenčarjev (Guraya, 1989

v Habič, 2012; Ogielska in Bartmanska, 2009 v Habič, 2012). Pri samici, ki je v jajčniku imela le previtelogene oocite II. zoritvene faze, nismo našli ne atrezij niti pigmentnih skupkov. Jajčnik omenjene samice je bil na zgodnji stopnji zoritve, in glede na ugotovitve zgoraj omenjenih avtorjev, pri tako zgodnji fazi oocitov ni pričakovati atrezij in posledično pigmentnih skupkov.

Ugotovili smo tudi, da je največ pigmentnih skupkov v jajčnikih samic, ki so bile stradale daljše časovno obdobje (štirinajst do osemnajst mesecev). Pri samicah iz narave in samicah stradanih ena do štiri mesece je pigmentnih skupkov bistveno manj, prav tako med obema skupinama samic (iz narave in stradale krajši čas) ni skoraj nikakršne razlike v povprečnem številu pigmentnih skupkov na rezino. Večje število pigmentnih skupkov v jajčnikih samic stradanih daljše obdobje se sklada s povečanim številom atretičnih foliklov, ki jih opisuje Habič (2012) pri dalj časa stradanih samicah. Pri ribah in dvoživk so atretični folikli normalen pojav, ki regulira število oocitov (Ogielska idr., 2010). Vendar pa so propadi jajčnih foliklov frekventnejši ob izpostavitvi osebkom različnim stresnim dejavnikom, med drugim tudi stradanju.

V pozni fazi atrezije, hipertrofirane celice folikla prebavijo in odstranijo oocite z rumenjacom, za seboj pa pustijo maso pigmenta obdano s hipertrofirano vezivno teko (Lofts 1984; Chieffi in Perantoni 1987, v Uribe Aranzabal, 2003). To je tudi razlog, zakaj so nekateri avtorji predvidevali, da so pigmentni skupki ostanki atrezij.

Pigmentni sistem v jajčnikih dvoživk je slabo raziskan. Kakšna je vloga pigmentnih celic v jajčnikih krastače *Bufo marinus* in žabe *Rana pipiens* sta se spraševala že Helmy in Hock davnega leta 1965. Predvidevala sta, da so pigmentne celice v jajčniku, tako kot tudi v jetrih, ključnega pomena za metabolizem pripadajočega tkiva. Danes se predvideva, da so pigmentne celice del ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema (v Habič, 2012). Mnogi jim pripisujejo funkcijo pri uničenju, razstrupljanju ali recikliranju endogenih in eksogenih materialov (Ferguson 1976; Ellis 1980; Herraezin Zapata 1986, v Agius in Roberts, 2003). V jajčniku močerila so najverjetneje neke vrste melanomakrofagi, ki vršijo fagocitozo in akumulacijo nastalih produktov v procesu degeneracije jajčnih foliklov (Habič, 2012).

Iz naših rezultatov lahko zaključimo, da so pigmentni skupki zastopani v jajčnikih, v katerih so tudi atretični folikli, kot tudi, da so številčnejši v jajčnikih samic stradanih daljše časovno obdobje.

6. LITERATURA

- Agius, C. in Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role. *Journal of Fish Diseases* 26, 499-509.
- Bizjak Mali, L. in Bulog, B. (2010). Ultrastructure of previtellogene oocytes in the neotenic cave salamander *Proteus anguinus anguinus* (Amphibia, Urodela, Proteidae). *Protoplasma* 246, 33-39.
- Bizjak Mali, L. in Bulog, B. (2011). Follicular ovarian atresia in the olm (*Proteus anguinus anguinus*). *September 4-9, 2011. Urbino, Italy. MCM*, 295-296.
- Bizjak Mali L., Talaber, I. Žibert, U. Ceket, D., Habič, L. in Bulog B. (2013). Oogenesis of the olm. *The anatomical record* 296 (spec. feat. 1), 230.
- Guraya S.S. (1989). Follicular atresia. *Indian National Science Academy*. 39, B, 311-332.
- Habič L. (2012). *Morfologija atrezij v jajčniku bele podvrste močerila (Diplomsko delo)*. Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.
- Henninger J.M. in Beresford W.A. (1990). Is it coincidence that iron and melanin coexist in hepatic and other melanomacrophages? *Histol Histopath* 5, 457-459.
- Linares-Casenave J., Van Eenennaam J.P. in Doroshov S.I. (2002). Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian in the white sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology* 18, 382-390.
- Močeril. Pridobljeno s svetovnega spleta-*. (17. avgust 2014). Pridobljeno iz Wikipedia: http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica
- Ogielska M., Rozenblut B., Augustynska R. in Kotusz A. 2010. Degeneration of germ line cells in amphibian ovary. *Acta Zoologica (Stockholm)* 91, 319-327.
- Prelovšek P.M. (2002). *Histokemijska in ultrastrukturalna analiza pigmentnih celic v jetrih močerila (Proteus anguinus, Amphibia, Urodela)*. *Magisterska naloga*. Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.
- Prelovšek P.M. in Bulog B. (2003). Biogenesis of Melanosomes in Kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). *Pigment Cell Res* 16, 345.
- Sket B. (1997). Distribution of *Proteus* (Amphibia: Urodela: Proteidae) and its possible explanation. *J Biogeogr* 24, 263-280.

Agius C. in Agbede S. A. (1984). An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology* 24, 471-488.

Uribe Aranzabal M.C. (2003). V: Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela. Jamieson B.G.M., Sever D.M. (eds). *The ovary and oogenesis.* Enfield, New Hampshire, USA: Science Publisher Inc.: 135-150.

Žibert, U. (2010). *Zoritev oocit v ovariju močerila (Diplomsko delo).* Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Wolke R.E., Murchelano R.A., Dickstein C. in George C.J. (1985). Preliminary evolution of the use of macrophage aggregates as fish health monitors. *Bulletion of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 222-227.