

POSTNATAL DÖNEMDE KOBAY OVARYUMLARI ÜZERİNDE ELEKTRON MİKROSKOBİK BİR ÇALIŞMA*

Derviş ÖZDEMİR

Gürsel DİNÇ

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.05.2002

An Electron Microscopic Study on Ovaries of the Guinea Pig During Postnatal Period

Summary

In this study, ultrastructural changes on ovaries of Quinea pigs during postnatal development were investigated. The study population was consisted of 56 female guinea pigs which were divided into seven groups according to age; 1 days, 2, 4, 6, 12, 18 week and older than 18 weeks. Each group contained 8 Quinea pigs.

It was shown that surface epithelium cells of ovaries have the usual cytoplasmic constituents such as the Golgi complex, mitochondria. The basement membrane beneath the epithelium have been gradually increased in thickness.

By the time maturity has been reached, there has been a great increase in electron density in both the nucleus and cytoplasm of the surface cells. The background cytoplasm of surface epithelial cells was comprising highly electron dense and lipid inclusions.

One of the most striking changes occurring during development is the increasing lobulation of the epithelial cell nuclei.

Key Words: Guinea pig, ovaryum, epithel, ultrastructural development

Özet

Bu araştırmada, kobay ovaryumlarında postnatal dönemde meydana gelen ultrastrüktürel değişimler incelendi. Çalışmada; bir günlük, iki, dört, altı, oniki, onsekiz hafta ve onsekiz haftalıkta büyük olmak üzere yedi grup oluşturuldu. Her grup sekizerli olacak şekilde toplam ellialtı adet dişi kobay kullanıldı.

Ovaryumların germinatif epitel hücrelerinin Golgi kompleksi, mitokondriyon gibi sitoplazmik organellere sahip olduğu görüldü. Epitel altındaki bazal membranın kalınlığı yaş ilerledikçe artmaktadır.

Ergenlik zamanı yaklaşlığında, yüzey epitel hücrelerinin hem nukleus hem de sitoplazmalarında elektron yoğunluğunda büyük bir artış meydana gelmektedir. Yüzey epitel hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda elektron- yoğun cisimcikler ve lipid inkuzyonları bulunmaktadır.

Gelişim boyunca göze çarpan en önemli değişiklik, epitel hücrelerinin nukleuslarındaki lobulasyon artışıydı.

Anahtar Kelimeler: Kobay, ovaryum, epitel, ultrastrüktürel gelişim

Giriş

Ovaryumlar, östrojen ve progesteron hormonlarını salgılayarak endokrin, dişi eşey hücresi olan ovumu meydana getirmekle de ekzokrin faaliyet gösteren bir çift organdır (12,13).

Ovaryumların prenatal dönemdeki histolojik yapısı üzerinde çalışan bazı araştırmacılar (11,14,15,17,18,24), prenatal yaşamın başlangıcında; ovariumların yüzeyinin germinatif epitel hücreleriyle kaplı olduğunu, bu epitel tabakasının altında hücre

kordonlarının bulunduğu, ovaryumun merkezi ile basal kısmının mezenşim dokusu ve kan damarlarından ibareti olduğunu bildirmiştir.

Memeli ovaryumlarının germinatif epitel hücrelerinde, postnatal büyümeyen farklı evrelerinde değişen sayıda multiveziküler cisimcikler mevcuttur. Epitel hücrelerinde, yüzey üzerindeki mikrovilli, pinositotik vezikül ve vakuollerin sayısı yaşın ilerlemesiyle artar. Seksüel olgunluğa erişildiğinde,

* Bu çalışma, doktora tezinin bir bölümünden özet olup, FÜNAF (Proje No: 337) tarafından desteklenmiştir.

yüzey hücrelerinin hem nukleus hem de sitoplazmasında elektron-yoğun cisimciklerde büyük bir artış görülür. Buna sitoplazmadaki serbest ribozomların artışı eşlik eder (18).

Memeli ovaryumları, üreme faaliyetleri başlamadan önce, etrafi tek katlı yassı granuloza hücreleri ile çevrili oosit içeren primordial folliküllerle doludur (1,9). Bu folliküller bazı türlerde (primat, ruminant) fetal yaşamda gelişirken, diğer türlerde (rodent, tavşan) neonatal hayatın başlangıcında gelişir (9). Follikül oluşumunda ilk önce oositler ve daha sonra yassı follikül hücrelerinin gelişimi ortaya çıkar (1,17). Primordial folliküldeki oosit, ortalama 25 mikrometre çapta olup yuvarlağımsı bir hücredir. Hafif eksantrik yerleşmiş büyük bir nukleusa ve büyük bir nukleolusa sahiptir. Sitoplazmasında çok sayıda mitokondriyon, birkaç Golgi cisimciği ve granüllü endoplazmik retikulum bulunur (1).

Yapılan incelemelerde, fare (17,18), rat (3,19,25), tavşan (4,6,7), hamster (2) ve kobay ovaryumları (2,5,7,8,10,21) üzerinde çalışmalara rastlanılmıştır. Ancak, postnatal dönemde kobay ovaryumlarının ultrastrüktürel düzeyde gelişimleri üzerine fazla çalışmaların olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, kobay ovaryumlarının doğumdan itibaren ultrastrüktürel yapılarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, dişi kobayların postnatal olarak farklı gelişme dönemlerinde ovaryumlarda meydana gelen ultrastrüktürel değişimler incelendi. Çalışmada, bir günlük, iki, dört, altı, oniki, onsekiz hafta ve onsekiz haftalıkta büyük olmak üzere yedi grup oluşturuldu. Her grup sekizerli olacak şekilde toplam ellialtı adet dişi kobay kullanıldı.

Kobaylar eter ile anestezi edildi ve öldürdü. Usulüne uygun bir şekilde (20) yapılan diseksiyondan sonra, ovaryumlardan alınan doku örnekleri, %2.5'luk gluteraldehit, paraformaldehit ve pH'sı 7.4'e ayarlanmış 0.1 M'lık kakodilat tamponundan oluşan ve pH'sı 7.2'ye ayarlanmış olan prefikzatif solüsyonuyla tespit edildi. Kakodilat tamponuyla yıkandıktan sonra, ozmiyum solüyonu ile postfikzasyon işlemi uygulandı. Kakodilat ve alkol serilerinden sonra uranil solüsyonuna tabi tutuldu ve alkol serileri bir kez daha tatbik edilerek propilen oksitten geçirildi. Araldit solüsyonu ile embedding-moldsda bloklama yapıldı. Hazırlanan bloklardan 1 mikrometre kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Toluidine mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskopuya bakılarak uygun bölge seçildi ve ultramikrotomda 300-700 Å kalınlıkta

ince kesitler alındı. Formvar kaplı bakır gridlere alınan dokulara uranil asetat ve lead-sitrat boyaması (22) uygulandı. Boyanan gridler Carl Zeiss EM 9 elektron mikroskobunda incelenerek fotoğraflandırıldı.

Bulgular

Bir günlük ovaryumların germinatif epitel hücrelerinin kübik şekilli ve sitoplazmalarının büyük bir bölümünü nukleusun işgal ettiği gözlandı. Mitokondriyon sayısının ve apikal yüzeyde yer alan mikrovillusların az sayıda olduğu dikkat çekmekteydi (Şekil 1).



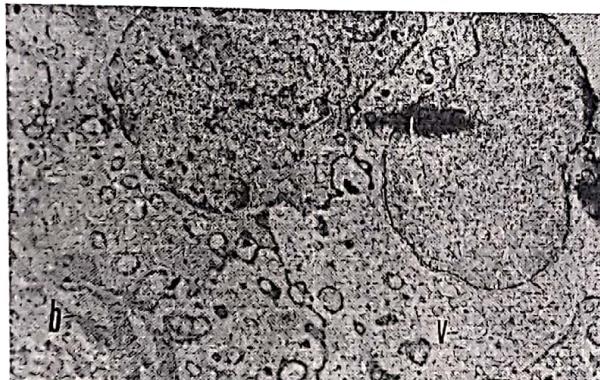
Şekil 1. Bir günlük ovaryumlarda kübik şekilli germinatif epitel hücreleri. Sitoplazmanın büyük bir kısmını işgal eden nukleus (n), Kurşun sitrat uranil asetat, X3000.

İki haftalık ovaryumlarda, yüzey epitel hücrelerin nukleuslarının hacminin küçülmekte olduğu ve lobuler bir yapı göstermeye başladıkları saptandı. Bir önceki gruba göre, mitokondriyonların sayısında büyük bir artışın olduğu, bazı bölgelerde kümelenmeler oluşturdukları gözlandı. Mitokondriyonların bazlarının yuvarlak, bazlarının ise tubuler bir yapı gösterdikleri belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. İki haftalıkarda ovaryum germinatif epitel hücrelerinde lobuler bir yapı göstermeye başlayan nukleus (n), mitokondriyonlar (m). Kurşun sitrat-uranil asetat, X4400.

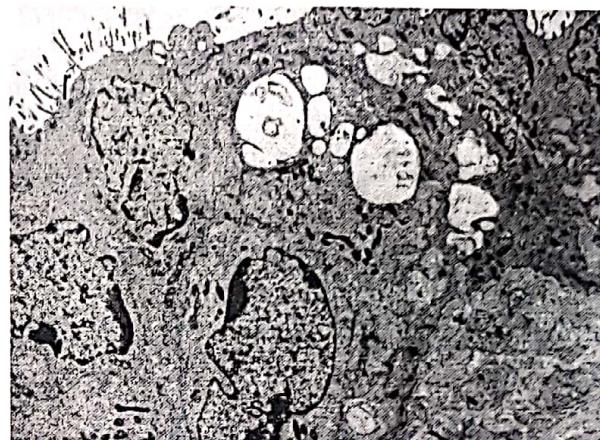
Dört haftalık ovaryumların yüzey epitel hücrelerinin de kübik hücrelerle kaplı olduğu, organellerin daha iyi geliştiği ve vakuolizasyonunoluştuğu tespit edildi. Bu grupta, daha önceki gruplara göre nukleus şekillerinin daha düzgün oldukları, hücreler arasındaki kaynaşmaların daha sıkı olduğu ve hücrelerin dayanmakta olduğu bazal membranın kalınlığında bir artışın olduğu gözlandı (Şekil 3).



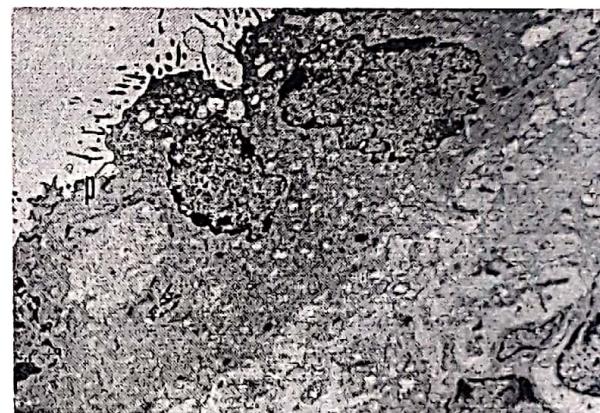
Şekil 3. Dört haftalıkarda ovaryum germinatif epitel hücrelerinin dayanmakta olduğu bazal membranın (b), kalınlığında bir artış ve vakuolizasyon görülmekte, vakuol (v). Kurşun sitrat-uranil asetat, X4400.

Altı haftalıkarda, germinatif epitel hücrelerin şekillerinde bir değişikliğin olmadığı, hücre yüzeyinden dışa doğru bol miktarda mikrovillusun çıktıgı gözlandı. Bu mikrovillusların boyları arasında uzunluk bakımından farklılıklar saptandı. Sitoplazmanın merkezinde bulunan nukleusun lobüler bir yapıya sahip olduğu ve nukleolusun genellikle nukleusun periferine yerleştiği gözlandı. Sitoplazmada lipid benzeri intrasitoplazmik cisimcikler de belirlendi. Germinatif epitel hücrelerinin sitoplazmasında ve hücrelerin birleşim yerleri arasında vakuollerin bulunduğu tespit edildi. Nukleusun alt tarafında endoplazmik retikulumlara rastlandı. Germinatif epitel hücrelerinin bazal membrana doğru yer yer çıkıştılar yaptığı belirlendi (Şekil 4).

Oniki haftalıkarda, germinatif epitel hücrelerinin kübikten alçak prizmatige doğru şekil değiştirdikleri tespit edildi. Germinatif epitel hücrelerinin sitoplazmasında pinositotik veziküller, lipid inkluzyonları ve elektron-yoğun inkluzyonlar sık sık görüldü. Lobüler bir yapıya sahip olan nukleusların şekillerinin, hücreler arasında farklılıklar gösterdiği belirlendi. Çoğu nukleuslar iki loptan oluşmasına rağmen, az bir kısmı da üç veya dört loptan oluşmaktadır. Sitoplazmanın yer yer bazal membraña doğru girintiler yaptığı ve bazal lamina tarafından desteklendiği gözlandı (Şekil 5).



Şekil 4. Altı haftalıkarda ovaryum germinatif epitel hücrelerin yüzeyinden dışa doğru uzanmakta olan mikrovilluslar (n), nukleusun periferine yerleşen nukleolus (s). Kurşun sitrat-uranil asetat, X3000.

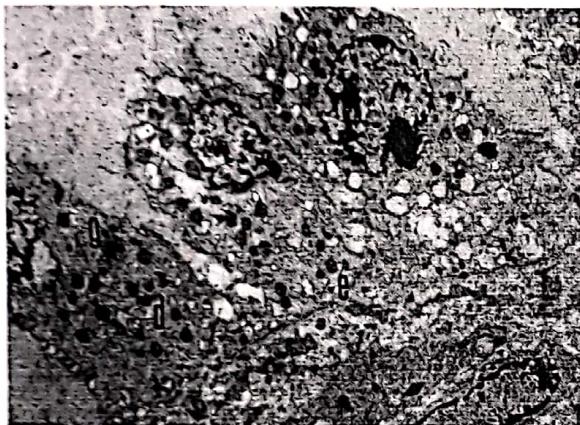


Şekil 5. Oniki haftalıkarda ovaryumun germinatif epitel hücreleri kübikten alçak prizmatige doğru şekil değiştirmekte ve çok sayıda pinositotik vezikül (p) görülmektedir. Kurşun sitrat-uranil asetat, X3000.

Onsekiz haftalık ovaryumlarda, germinatif epitel hücrelerin şekilleri alçak prizmatikti. Sitoplazmadaki elektron-yoğun cisimciklerde ve lipid inkluzyonlarında bir artış gözlandı. Nukleusun sitoplazmanın genellikle periferine yakın bulunduğu ve nukleolusun çoğunlukla distal ucta bulunduğu gözlandı. Mitokondriyonların, Golgi cisimciği ile nukleusa yakın bir şekilde bulunduğu ve endoplazmik retikulumun genişlemekte olduğu saptandı. Bazal membranın kalınlığında bir artışın meydana geldiği dikkat çekmekteydi (Şekil 6).

Onsekiz haftalıkta büyük ovaryumlarda germinatif epitel hücrelerin şekillerinin de alçak prizmatik oldukları gözlandı. Sitoplazmada bol miktarda vakuol ve intrasitoplazmik inkluzyonlara da rastlandı. Lipid cisimciklerinde belirgin bir artışın meydana geldiği dikkat çekmekteydi. Hücreler arasında pinositotik veziküllerin hacimlerinin diğer

yaş gruplarına göre daha fazla olduğu görüldü. Nukleus şeklärinin ovalden at nahi şeklärine kadar değişikleri, nukleusların diğer gruptardan farklı olarak sitoplazmanın daha çok proksimal kısmında bulundukları, distal kısımlarında ise endoplazmik retikulum ve çok sayıda mitokondriyonun yer aldığı görüldü. Yassı epitel hücreleriyle bazal lamina arasındaki sınırın, diğer yaş gruplarına göre daha düzgün olduğu tespit edildi (Şekil 7).



Şekil 6: Onsekiz haftalıkarda ovaryumun germinatif epitel hücrelerinde çok sayıda elektron-yoğun cisimcikler (e), endoplazmik retikulum (d) ve Golgi cisimciği (g). Kurşun sitrat-uranil asetat, X3000.



Şekil 7. Onsekiz haftalıkta büyüklerde ovaryumun germinatif epitel hücrelerinde sayıları artmaktadır vakuoller (v), pinositotik veziküler (p) ve lipid cisimcikleri (l). Kurşun sitrat-uranil asetat, X3000.

Genel olarak tüm gruptarda primordiyal folliküllerde, oositin etrafında yassı follikül hücreleri ile mekik şeklärindeki fibroblastların bulunduğu ve bu hücrelerin nukleuslarının genellikle benzer olup, oval şeklärini gözlemedi.

Primordiyal folliküllerde oositin oval şeilde olduğu, içerisinde kristal bir yapıya sahip birkaç adet

mitokondriyon ve veziküler tipte olan Golgi kompleksi görüldü. Mitokondriyonlar arasında birkaç adet elektron-yoğun materyal içeren veziküler de görülmekteydi. Oositin etrafında yassı follikül hücrelerinin tek sıra halinde dizildikleri belirlendi. Oosit hücresinin nukleolusu pek belirgin olmamasına rağmen, follikül hücrelerinin nukleoluslarının oldukça belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 8. Primordiyal oosit (o) ve etrafını saran granulosu hücreleri (g). Kurşun sitrat-uranil asetat, X3000.

Primer folliküllerdeki oositin oval şeilli ve büyük bir nukleusa sahip olduğu görüldü. Nukleusun yakın olduğu kutupta az sayıda, diğer kutupta ise çok sayıda mitokondriyon topluluklarına rastlanıldı. Mitokondriyonların bazılarının oosit yüzeyine çok yakın, bazılarının ise oosit yüzeyinden biraz uzakta olduğu saptandı. Mitokondriyonların kesite bağlı olarak bir kısmının yuvarlak, bir kısmının ise oval şeilde olduğu saptandı. Oosit sitoplazmasında elektron-yoğun noktalar halinde kortikal granüller görüldü. Nukleusun değişen yoğunlukta granüler materyal içeriği tespit edildi. Nukleolus gözlenmedi (Şekil 9).



Şekil 9: Primer oosit (o) etrafını saran oolemma (om), kortikal granüller (k). Kurşun sitrat-uranil asetat, X3000.

Oosit hücrelerinin yüzeyinden mikrovillusların çıktıgı ve oosit ile follikül hücrelerini biribirlerine bağlayan desmozom benzeri yapıların bulunduğu tespit edildi. Primer oositlerin oolemmasının, primordial folliküllerin oolemmasına göre daha kalın olduğu gözleendi. Primer oositlerdeki mitokondriyon sayısının, primordiyal oositlere göre sayıca fazla olduğu saptandı (Şekil 8-9).

Tartışma

Ovaryumların germinatif epitel hücrelerinin kobaylarda kübik ya da alçak prizmatik (13); hamsterlerde yassıdan alçak prizmatige doğru şekil değiştirdikleri (23); insanlarda kübik ya da prizmatik (16); ratlarda ise, kübik veya yassı hücrelerden (25) oluştuğu bildirilmiştir. Araştırmada ise germinatif epitel hücrelerinin literatür bildirimlerinden farklı olarak, kübikten alçak prizmatige doğru şekil değiştirdikleri tespit edildi.

Wischnitzer (24), fare ovaryumlarının yüzey epitelinde; yassı, kübik ve prizmatik olmak üzere üç değişik şekilde hücrenin birlikte bulunabileceğini, Weakley (23), hamster ovaryumlarında yassıdan alçak prizmatige doğru şekilleri değişen hücrelerin görüldüğünü, Jeppesen (14) ise kobaylarda aynı ovaryumda yüzey epitelinde bulunan hücrelerin şekillerinin aynı olduğunu bildirmiştirlerdir. Araştırmada yüzey epitel hücrelerinin tümünün ya kübik ya da alçak prizmatik oldukları tespit edildiğinden, sonuçlar Jeppesen (14) ile uyumlu, Wischnitzer (24) ve Weakley (23) ile uyumsuzdur.

Deanesly (6) tavşanlarda postnatal dönemde ovaryumun yüzey epitel hücrelerinde invaginasyonların bulunduğu, fakat kobay ovaryumlarının yüzey epitellerinde böyle oluşumların bulunmadığını bildirmiştir. Jeppesen (14) ise kobay ovaryumlarında yüzey epitel hücrelerinde invaginasyonların bulunduğu belirtmiştir. Ovaryum yüzey epitel hücrelerinde invaginasyonlar gözlendiğinden, bulgular Jeppesen (14) ve Deanesly (6)'in tavşan ovaryumlarına ilişkin bulgularıyla uyumlu, Deanesly (6)'in kobay ovaryumlarına ilişkin bulgularıyla uyumsuzdur.

Kaynaklar

1. Adams EC and Hertig AT. Studies on the guinea pig oocytes. I Electron microscopic organelles in oocytes of primordial and primary follicles. *J Cell Biol* 1964; 21: 397-427.
2. Bookhout CG. The development of the guinea pig ovary from sexual differentiation to maturity. *J Morph* 1945; 77: 233-263.
3. Dahl E. Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. I a comparative study of the fine structure of ovarian interstitial tissue in the rat and the domestic fowl. *J Anat* 1970; 108: 275-290.
4. Davies J and Broadus CD. Studies on the fine structure of ovarian steroid-secreting cells in the rabbit. *Am J Anat* 1968; 123: 441-474.

Kobay, fare ve hamsterlerde ovaryum epitel hücrelerin nukleuslarının lobüler bir yapıda oldukları, epitel hücrelerinin yüzeyinde çok sayıda mikrovillusun bulunduğu (14,23,24) ve ayrıca farcelerde nukleusun sitoplazmanın apikal yüzeyine yakın yer aldığı (23) bildirilmiştir. Bu çalışmada da nukleusların lobuler bir yapıya sahip oldukları gözleendi. Altı ve oniki haftalıkarda nukleusların daha çok merkeze yerleştiği, onsekiz ve daha ileriki haftalıkarda ise nukleusların apikal yüzeye yakın yerleşikleri saptandı. Ayrıca, epitel hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovillusun bulunduğu yönündeki bildirim de doğrulanmıştır.

Jeppesen (14) ve Weakley (23)'e göre ovaryumların gelişimi boyunca germinatif epitel altındaki bazal membranın kalınlığında bir artış meydana gelir. Çalışmada da benzer bulgular saptandı.

Hamster germinatif epitel hücrelerin sitoplazmasında lipid inkluzyonlarının olağan bir şekilde bulunduğu ve yaşın ilerlemesiyle lipid cisimciklerinin sayısında belirgin bir derecede artış olduğu şeklindeki bildirim (23), çalışma bulgularıyla aynı doğrultudadır.

Odor ve Blandau (17), fare oositlerinde Golgi kompleksinin veziküler bir yapıya sahip olduğunu, elektron-yoğun materyal içeren veziküllerin mitokondriyonlarla bir arada bulunduklarını bildirmiştirlerdir. Araştırmadaki bulgular da literatür bildirmi ile paralellik göstermektedir.

Bazı çalışmalara (1,17) göre, primer oositlerin sitoplazmalarındaki mitokondriyonların, bir kısmı hücre yüzeyine, bir kısmı ise nukleusa yakın bulunur. Primordiyal oositlere kıyasla mitokondriyon sayısının fazla olduğu ve ayrıca, primer oositlerin sitoplazmasında kortikal granüllerin varlığı açıklanmıştır. Benzer bulgulara araştırmada da rastlanılmıştır.

Sonuç olarak, literatür bilgilerinden önemli farklılıklar elde edilmemekle beraber gruplar arasında ovaryumda belirgin değişikliklerin olduğu saptanmıştır.

5. Davies J, Russel M, Davenport GR. Effects of maternal administration of the diethylstilbestrol and estradiol on the newborn guinea pig. *Acta Anat* 1985; 122: 39-61.
6. Deanesly R. Origins and development of interstitial tissue in ovaries of rabbit and guinea pig. *J Anat* 1972; 113: 251-260.
7. Deanesly R. Follicle formation in the guinea pigs and rabbits: A comparative study with notes on the rete ovarii. *J Reprod Fert* 1975; 45: 371-374.
8. Donovan BT. Changes in the concentration of luteinizing hormone in plasma during development in the guinea pig. *J of Endocrinology* 1975a; 64: 511-520.
9. Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 1994; 50: 225-232.
10. Garris DR and Foreman D. Follicular growth and atresia during the last half of the luteal phase of the guinea pig estrous cycle: Relation to serum progesterone and estradiol levels and utero-ovarian blood flow. *Endocrinology* 1984; 115: 73-77.
11. Gondos B. and Zamboni L. Ovarian development: The functional importance of germ cell interconnections. *Fertility and Sterility* 1969; 20: 176-189.
12. Guraya SS. Morphological and histochemical alterations of ovarian stroma during the foetal and postnatal life of the guinea pig. *Arch Ital Anat Embriol* 1977; 82: 2-49.
13. Hafez ESE. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Mammals*. Philadelphia. Lea and Febiger, 1970.
14. Jeppesen TH. Surface epithelium of the fetal guinea pig ovary. A light and electron microscopic study. *Anat Rec* 1975; 183: 499-516.
15. Jeppesen TH. The ultrastructure of follicle cells in fetal guinea pig ovaries. *Anat Rec* 1977; 189: 649-668.
16. Mossman HW, Koering MJ and Darwin F. Cyclic changes of interstitial gland tissue of the human ovary. *Am J Anat* 1964; 115: 235-256.
17. Odor DL and Blandau RJ. Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and oogenesis. *Am J Anat* 1968; 124: 163-186.
18. Odor DL and Blandau RJ. Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. II. Cytodifferentiation. *Am J Anat* 1969; 125: 177-216.
19. O'shea JD. An ultrastructural study of smooth muscle-like cells in the theca externa of ovarian follicles in the rat. *Anat Rec* 1970; 167: 127-140.
20. Özeti N ve Atatür M. Omurgalıların Diseksiyon Kılavuzu. Ege Üniv Fen Fak Kitapları Serisi. No: 70, İzmir, 1975.
21. Peddie MJ. Follicular development in the immature guinea pig. *J Endocrinol* 1980; 84: 323-331.
22. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol* 1963; 17: 208-212.
23. Weakley BS. Differentiation of the surface epithelium of the hamster ovary. An electron microscopic study. *J Anat* 1969; 105:129-147.
24. Wischnitzer S. The ultrastructure of the germinatif epithelium of the mouse ovary. *J Morph* 1965; 117: 387-400
25. Yecan N, Ozan E. Fötal dönemde rat ovaryumlarının histogenesi üzerinde ışık mikroskopik bir çalışma. *FÜ Sağlık Bil Dergisi* 1994; 10: 169-174.