

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

**ВАЛЕНТИНА ПРОДАНОВА ХАДЖИНЕШЕВА**

**София – 2018**

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ

---

**ВАЛЕНТИНА ПРОДАНОВА ХАДЖИНЕШЕВА**

АСИМЕТРИЯ И ПОЛЯРНОСТ НА ОВОЦИТИ ОТ  
БОЗАЙНИЦИ В УСЛОВИЯ НА КЛЕТЪЧНО  
ДИФЕРЕНЦИРАНЕ И ПАТОЛОГИЯ

## **ДИСЕРТАЦИЯ**

За присъждане на образователна и научна степен „доктор”

Област на висше образование

4. „Природни науки, математика и информатика“

Професионално направление 4.3. „Биологически науки“

Докторска програма „Ембриология“

Научни ръководители:

Доц. РАЛИЦА СТЕФАНОВА ЖИВКОВА, д.б.

Доц. МАЙЯ ДЯНКОВА МАРКОВА, д.б.

София, 2018

Изказвам сърдечна благодарност на научните си ръководители доц. Ралица Живкова и доц. Майя Маркова за ценните напътствия и всеотдайната помощ. Благодаря и на колегите от катедра Биология за подкрепата при разработването на този труд.

## Съдържание

Списък на съкращенията	1
1. ВЪВЕДЕНИЕ	2
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	4
2.1. Общи данни за овогенезата и фоликулогенезата при бозайници	4
2.1.1. Етапи на овогенезата	4
2.1.2. Начало на фоликулогенезата: образуване на зародишни гнезда и примордиални фоликули	7
2.1.3. Фоликулно активиране, зреење и атрезия	12
2.1.4. Нарушения в овогенезата и фоликулогенезата при синдром на поликистозните яйчници	16
2.2. Асиметрия и полярност на овоцитната цитоплазма	19
2.2.1. Цитоплазмена сегрегация при животни, различни от плацентните бозайници	19
2.2.2. Телце на Балбиани	21
2.3. Разпределение на избрани компоненти на овоцита по време на овогенезата	25
2.3.1. Разпределение на цитоскелетните елементи	25
Микротубули и техни организационни центрове. Роля на PCM-1	25
Микрофиламенти	28
Интермедиерни филаменти	30
2.3.2. Разпределение на мембранните органели	33
Митохондрии	33
Апарат на Голджи	35
3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	39
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	40
4.1. Използван биологичен материал	40
4.2. Реактиви за специфично белязване на клетъчни компоненти	41
4.2.1. Първи антитела	41

4.2.2. Втори антитела	42
4.2.3. Други реактиви за визуализация на клетъчни компоненти	42
4.3. Допълнителни реактиви, разтвори и буфери	43
4.4. Използвани специфични апарати, консумативи и лабораторни съдове	44
4.5. Използвани лабораторни методи	45
4.5.1. Депарафиниране и хидратиране на овариалните срези	45
4.5.2. Блокиране на неспецифична флуоресценция	45
4.5.3. Флуоресцентно белязване за специфични клетъчни компоненти в яйчниковите срези	46
4.5.4. Оцветяване с хематоксилин – еозин	47
4.5.5. Получаване на зреещи овоцити	47
4.5.6. Наблюдение и документиране на резултатите	49
5. РЕЗУЛТАТИ	50
5.1. Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули	50
5.2. Особенности на овогенезата и фоликулогенезата в неонатален миши яйчник – характерни морфологични разлики в срези от едnodневни и двудневни мишки	59
5.3. Локализация и асиметрично разпределение на фибриларен актин и комплекс на Голджи в овоцити от новородени мишки	65
5.4. Локализация и динамика на РСМ-1 и митохондриален маркер в овариални срези от новородени мишки	69
5.5. Сравнение на локализацията на РСМ-1 и интермедиерни филаменти в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки	76
5.6. Експресия на маркер за зародишна герминативна линия в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки	83
5.7. Локализация и динамика в разпределението на РСМ-1 по време на мейотичното зреене на миши овоцити	84
6. ОБСЪЖДАНЕ	89
6.1. Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна	

структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули	89
6.2. Особености на овогенезата и фоликулогенезата в неонатален миши яйчник – характерни морфологични разлики в срези от едnodневни и двудневни мишки	93
6.3. Локализация и асиметрично разпределение на фибриларен актин и комплекс на Голджи в овоцити от новородени мишки	95
6.4. Локализация и динамика на РСМ-1 и митохондриален маркер в овариални срези от новородени мишки	98
6.5. Сравнение на локализацията на РСМ-1 и интермедиерни филаменти в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки	102
6.6. Експресия на маркер за зародишна герминативна линия в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки	104
6.7. Локализация и динамика в разпределението на РСМ-1 по време на мейотичното зреене на миши овоцити	105
7. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ	110
8. БИБЛИОГРАФИЯ	112

## Списък на съкращенията

РНК - рибонуклеинова киселина

АМФ – аденозинмонофосфат

мРНК – матрична рибонуклеинова киселина

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

F-актин – фибриларен актин

G- актин – глобуларен актин

АТФ – аденозинтрифосфат

DDX4 – DEAD box protein 4

GV – Germinal vesicle

PB - Polar body

FSH – Follicle stimulating hormone

LH - Luteinizing hormone

PCOS - Polycystic Ovary Syndrome

PCM - pericentriolar material

MTOC – Microtubule organizing center

IF - intermediate filaments

GRASP – Golgi ReAssembly Stacking Protein

GM130 - Golgi matrix protein 130

VDAC - Voltage-dependent anion channel

FITC – Fluorescein isothiocyanate

TRITC –Tetramethylrhodamine isothiocyanate

PBS – Phosphate-buffered saline

BSA – Bovine serum albumin

PFA – Paraformaldehyde

## 1. Въведение

Всеки животински и човешки организъм започва своето съществуване от зигота – оплодена яйцеклетка. Клетките, получени при нейното делене, наново изграждат тъканното, органното и системното ниво на организация. Ето защо, за да се разбере развитието на организма, са нужни задълбочени познания върху процеса на образуване на яйцеклетката – овогенезата. Механизмите, които осигуряват огромния потенциал на тази забележителна клетка, днес се изучават на клетъчно и молекулно равнище. Ембрионалното развитие на човека и другите плацентни бозайници се основава на ембрионална индукция, т.е. образуването на органите и диференцирането на тъканите се направлява от молекулни сигнали, които се отделят от определени клетки и влияят върху друга съвкупност от клетки. Поради постепенното детерминиране на клетките посредством взаимодействието помежду им развитието на плацентните бозайници е регулативно. Това означава, че в ранните му етапи непредвидени събития като загуба или добавяне на клетки могат да се компенсират, като наличните клетки чрез отделяне на сигнали разпределят помежду си пътищата на диференциране така, че да изградят пълноценен организъм.

Многоклетъчните животни извън групата на плацентните бозайници също използват ембрионалната индукция по време на зародишното си развитие. При тях обаче има и друг, не по-малко важен механизъм за направляване на органогенезата и хистогенезата – автономно детерминиране на ембрионалните клетки посредством избирателно включване в цитоплазмата им на различни морфогенетични детерминанти, т.е. регулаторни белтъци и кодиращи ги мРНК. За да определят различни пътища на диференциране, тези морфогени образуват в цитоплазмата на зиготата струпвания и градиенти, които могат да се оформят окончателно при оплождането, но обикновено се залагат още в овоцита при овогенезата. С други думи, в по-голямата част от животинския свят създаването на асиметрия и полярност в овоцита е основна предпоставка за нормално зародишно развитие. Интересна структура в това отношение е т. нар. телце на Балбиани – преходен комплекс от органели и макромолекули, който е

разположен в цитоплазмата на ранния профазен овоцит в съседство с ядрото и има значение за определянето на полярността в овогенезата на риби, земноводни и птици.

По отношение на своите овоцити и ранни ембриони плацентните бозайници са рядко изключение сред многоклетъчните животни, при това с вторичен характер. Еволюцията им се характеризира със загуба на изходното амниотично яйце и неговите цитоплазмени градиенти. Яйцата им са вторично изолецитални, без изразено натрупване на жълтък. Градиенти на морфогени в цитоплазмата не са установени. Лишени от морфогенетични сигнали с майчин произход, зародишите на плацентните бозайници имат изцяло регулативно развитие и разчитат само на ембрионалната индукция. Независимо от това ранните овоцити от развиващия се яйчник показват асиметрично разпределение на определени клетъчни органели и дори временното им обединяване в комплекс, приравнен от редица автори към телцето на Балбиани. Еволюционното съхранение на дадена структура по правило предполага и наличие на функция – запазване поне до известна степен на изходната функция или придобиване на нова. Към настоящия момент обаче асиметрията на овоцитите от плацентни бозайници е твърде слабо изучена както в структурно, така и във функционално отношение, а малкото налични данни са противоречиви. Настоящият дисертационен труд, посветен на асиметрията и полярността на овоцитите от бозайници, е опит да се допринесе за решаването на тези интересни и засега неизяснени въпроси.

## **2. Литературен обзор**

### **2.1. Общи данни за овогенезата и фоликулогенезата при бозайници**

#### **2.1.1. Етапи на овогенезата**

Яйцеклетките (овоцити) са едни от най-удивителните клетки в живия свят: високата им специализация осигурява появата и нормалното развитие на нов индивид в резултат на оплождането. Образоването им започва още през ембрионалното развитие. При бозайници първичните полови клетки (гоноцити) първоначално се намират в задната част на жълтъчната торбичка – екстраембрионална структура близо до алантоиса и задното черво. Впоследствие те мигрират през алантоиса към формиращите се яйчници, където вече се наричат овогонии. Докато гоноцитите са полово недиференцирани, овогонииите вече имат белези, които ги характеризират като женски герминативни клетки. Те се делят синхронно чрез митоза, увеличавайки броя си. При мишка първичните полови клетки извършват миграцията си около 10-тия ден след оплождането и се делят митотично до 13.5 ден (Monk and McLaren, 1981; McLaren, 2000).

Диференцирането на овогонииите в първични овоцити (овоцити от I ред) се бележи от обвързване с мейозата: клетката реплицира своята ДНК, след което навлиза в профаза I на мейотичното делене (Pepling, 2006). Изключителната важност на този етап е свързана както с паралелната конюгация на хомоложните хромозоми и протичането на кросинговър, така и с нарастване на клетката и синтез на резервни вещества, обезпечаващи правилното протичане на оплождането и първите митотични деления на зародиша. Образуват се обвивките на яйцето, кортикалните гранули, множество рибозоми, жълтъчна материя и гликоген, както и матрична РНК, необходима за синтез на първите белтъци в новоформирания зародиш. При човека овогонииите навлизат в мейоза и съответно вече се наричат овоцити в периода между 8 и 13 гестационна седмица, а при мишка – между 13.5 и 16.5 ден след оплождане при мишка, т.е. през последната седмица преди раждането (Byskov et al., 1997; Pepling, 2012). Навлизането в мейоза се стимулира от молекулярния сигнал ретиноева киселина

(Bowles et al., 2006; Bowles and Koopman, 2007). След това напредването на мейотичната профаза I се регулира от цикличен АМФ, синтезиран в овоците (Wang et al., 2015).

При бозайниците овогенезата протича с продължително прекъсване: след завършване на рекомбинацията в пахитения стадий на мейотичния цикъл, клетките преминават в особен период на покой, наречен *dictyate* (англ. от ст. гр. δίκτυον „мрежа“). Терминът се използва в овогенезата вместо диплотен, защото не съответства точно на диплотения стадий, известен при сперматогенезата. При бозайниците яйцеклетките, формиращи се в този ранен етап на развитието, съставляват целия резерв за репродуктивния живот на женския индивид (Faddy et al., 1992; Kezele et al., 2002). Някои автори в последно време обсъждат възможността за *de novo* овогенеза от стволови клетки във възрастния яйчник (Bukovsky et al., 2004, 2008; Parte et al., 2014), но техните изследвания засега не търпят съпоставка с огромната маса от натрупани данни, подкрепящи описаната по-горе парадигма. Разделянето на герминативните от соматичните клетки настъпва рано в развитието на многоклетъчните животни и е свързано с експресия в герминативните клетки на набор от белтъци-маркери, които отговарят за запазване на тотипотентността и липсват в соматичните клетки. Например белтъкът DDX4 (DEAD box protein 4), често наричан и Vasa по името на своя хомолог у *Drosophila*, се открива в цитоплазмата на герминативните клетки при двата пола на всички етапи от диференцирането им, докато соматичните клетки са лишени от него (Stoop et al., 2005; Song et al., 2016). DDX4 спада към РНК-хеликазите – ензими, участващи в сплайсинга, биогенезата на рибозомите, инициацията на транслацията и други процеси, изискващи промяна на вторичната структура на РНК. В частност за DDX4 има данни, че потиска експресията на гените на транспозоните и възпроизводството на ретротранспозоните и по този начин поддържа стабилен генома на герминативните клетки (Hadziselimovic et al., 2011).

Навлизането в *dictyate* при човека и повечето други бозайници става още по време на пренаталното развитие, а при видове с кратка бременност като мишката може да обхване и периода непосредствено след раждането. При това

мейозата не настъпва едновременно за всички герминативни клетки в яйчника, т.е. много овогонии продължават да се делят митотично, докато други вече са първични овоцити, навлезли в профаза I (Evans et al., 1982). Например при мишка спирането на мейозата в dictyate започва на около 17 ден от бременността и продължава до 5 дни след раждането (Borum, 1961; Dutta et al., 2016).

По-нататъшното развитие на овоцитите става под хормонален контрол и се нарича зреене. То настъпва от пубертета до края на репродуктивния период, като засяга определена група (коHORTа) овоцити през всеки менструален, съответно естрален цикъл. В началото на зреенето в овоцита още присъства голямото профазно ядро, наречено зародишно мехурче или герминален везикул. Това ядро и самият стадий, на който то се наблюдава, често се означават със съкращението GV (germinal vesicle).

Зреенето започва с възобновяване на мейозата, което изисква сложно взаимодействие на хипоталамус, хипофиза и яйчник и каскадни процеси на ендокринна регулация с обратна връзка. Ядрената обвивка се фрагментира на малки мехурчета – процес, означаван като разпадане на GV. След това зреещите овоцити навлизат в метафаза I, като бивалентите се подреждат екваториално, за да се разделят хомолозите през анафаза I. След телофаза I цитоплазмата се разделя асиметрично и се отделя първото полярно телце (polar body I, PB I), съдържащо половината хромозоми на яйцеклетката. При повечето гръбначни животни и човека зреещият вторичен овоцит (овоцит от II ред) не завършва второто си мейотично делене, а спира в метафаза II. В момента на овулацията яйцеклетката представлява голяма клетка с периферно разположено делително вретено, в екваториалната плоскост на което се разполагат метафазните хромозоми. Те са хаплоиден брой, но всяка от тях все още е изградена от две хроматиди, свързани в центромерната област. В перивителинното (субзонално) пространство, обикновено в близост с вретеното, се намира първото полярно телце. Стимул за завършване на мейозата дава навлизането на сперматозоид при евентуално оплождане (Erpig, 1996; Овчаров и Такева, 2009; Чучков, 2001).

### **2.1.2. Начало на фоликулогенезата: образуване на зародишни гнезда и примордиални фоликули**

Овогенезата не е клетъчно-автономен процес, а резултат от взаимодействие на герминативните клетки помежду им и със соматичните клетки. Най-важно е взаимодействието между герминативната клетка и заобикалящите я соматични клетки на яйчника. Негова структурна основа е фоликулът – комплекс, образуван от овоцита и заобикалящите го соматични клетки, наречени фоликулни. Образуването и развитието на фоликула се нарича фоликулогенеза и подобно на овогенезата има сложен ход във времето с продължително прекъсване, отговарящо на dictyate. Правилното протичане на фоликулогенезата е от съществено значение за осъществяване на репродуктивния потенциал при бозайниците и човека.

По време на ранното пренатално развитие, докато гоноцитите се обособяват в екстраембрионалните тъкани, ембрионалната мезодерма образува полови гребени – предшественици на половите жлези. Поради разликата в местоположението първичните полови клетки трябва да мигрират, за да колонизират бъдещите гонади. В момента на тази миграция половите жлези са недиференцирани, но скоро в резултат на генетичен сигнал съобразно половите хромозоми се диференцират като мъжки (семенници) или женски (яйчници) (Monk and McLaren, 1981).

След установяването си в яйчника овогонииите започват поредица от синхронни митотични деления, които протичат с непълна цитокинеза. Дъщерните овогонии остават свързани чрез междуклетъчни цитоплазмени мостове и скоро образуват групи от свързани помежду си клетки, наречени зародишни гнезда или герминативни цисти (germline cysts). Описаният процес се отличава с еволюционна консервативност – според неотдавнашни проучвания зародишните гнезда при бозайници проявяват набор от общи характеристики със зародишните гнезда на *Drosophila* и други безгръбначни (Pepling and Spradling, 1998; Haglund et al., 2011).

Междуклетъчните мостове се запазват и когато овогонииите преминават в ранни профазни овоцити (до стадий dictyate). В овоцитите, свързани по този

начин, в граничните участъци около мостовите се наблюдават везикули, вероятно от апарата на Голджи. Други цитоплазмени компоненти като гладка и зърнеста еноплазмена мрежа, рибозоми и митохондрии също се наблюдават в междуклетъчните мостове. Присъствието на такива везикули и органели в мостовите предполага, че тези връзки между клетките осигурява трансфер на органели и други компоненти от един овоцит на друг. Следователно тези междуклетъчни мостове вероятно са важни за изхранването и зреенето на определени избрани овоцити, както и за синхронизацията на мейотичните събития (Ruby et al., 1969).

Освен помежду си герминативните клетки установяват контакт и със соматичните клетки на яйчника. Зародишните гнезда при бозайници се заобикалят от плоски епителни соматични клетки, наречени прегранулозни (Byskov, 1986; Pepling and Spradling, 2001; Pepling, 2012). Взаимодействието на овоцитите с тези клетки постепенно ще измести взаимодействието помежду им. Всеки овоцит, който завърши успешно този процес, се оказва заобиколен от слой гранулозни клетки, продукт на диференцирането на прегранулозните клетки. Те влизат в тесен контакт с овоцита: опити с белязани съединения установяват пренос на вещества между двата типа клетки още на този ранен етап (De Felici et al., 1999). Образуването, съставено от овоцита и заобикалящите го гранулозни клетки, се нарича фоликул, а процесът на неговото оформяне и развитие – фоликулогенеза.

Разпадането на зародишните гнезда и образуването на фоликули се регулира по хормонален път. Установено е, че сравнително високото естрогенно съдържание поддържа зародишните гнезда, а понижаването му предизвиква разпадане на гнездата (Chen et al., 2007). Феталният яйчник произвежда естрогени, и то в количества, които в ранните етапи на феталното развитие осигуряват образуване и запазване на зародишните гнезда. В късното фетално развитие синтезата на естрогени намалява, което служи като сигнал за разпадане на зародишните гнезда и образуване на фоликули (Dutta et al., 2014). При човека и макака повечето фоликули се формират през 21 гестационна седмица (Pepling and Spradling, 1998, 2001).

При мишка преходът от зародишни гнезда към фоликули се подпомага от раждането, което прекъсва връзката с плацентата и така изолира развиващия се яйчник от естрадиола в майчиното кръвообращение. В мишия яйчник отделни фоликули могат да се наблюдават още преди раждането (около 17 дни след оплождането), но броят им е малък (Dutta et al., 2014). Към момента на раждането, което при повечето линии мишки настъпва около 20-21 ден от бременността, множество зародишни гнезда все още присъстват в яйчника (Pepling and Spradling, 2001), но два дни по-късно вече са се разпаднали и повечето фоликули са се формирали (Chen et al., 2007). Ето защо първите два дни от неонаталния период при мишка са ключов етап от развитието на яйчника, фоликулогенезата и самата овогенеза.

Разпадането на зародишните гнезда е сложен процес, осъществяван чрез различни взаимно допълващи се механизми. Сигналът за разпадането се предава на овоцитите от прегранулозните клетки чрез молекули от Notch-семейството, което е известно с функциите си в определянето на съдбата на диференциращите се клетки (Xu and Gridley, 2013). Освен чрез Notch-сигнализация прегранулозните клетки допринасят за разпадането на гнездата и пряко. Те навлизат в гнездата и разделят герминативните клетки механично (Hirshfield, 1991; Pepling and Spradling, 2001) и чрез отделяне на протеази, които прекъсват междуклетъчните мостове, свързващи овоцитите (Tingen et al., 2009). Процесът показва ясно изразена зоналност: в яйчник от мишка или плъх разпадането на зародишните гнезда и формирането на примордиални фоликули започва първо в медуларната зона на яйчника на 17.5 ден след оплождането при мишка, а след раждането напредва и към кортикалните региони на яйчника (Rajah et al., 1992; Pepling et al., 2010).

Разпадането на зародишните гнезда и разделянето на овоцитите е необходимо условие за нормалното протичане на фоликулогенезата. Ако новородени мишки бъдат експериментално третирани с естрогени, това води до твърде продължително запазване на междуклетъчните мостове между овоцитите. В резултат, след като животните достигнат полова зрялост, в яйчниците им се

откриват абнормални фоликули, съдържащи по два и повече овоцита (Chen et al., 2007).

Нормално разпадането на зародишните гнезда води до получаване на единични овоцити. Всеки овоцит се обгражда от пролифериращи прегранулозни клетки, които образуват около него цялостен единичен слой. Така във феталния (при мишка – неонаталния) яйчник се формират фоликули (Tingen et al., 2009; Wear et al., 2016). Новообразуваните фоликули се наричат примордиални. Те съдържат единичен овоцит, заобиколен от един слой плоски фоликулни клетки, на този етап вече наричани гранулозни. Овоцитите в примордиалните фоликули са претърпели известен растеж – съотношението цитоплазма : ядро при тях е по-голямо от това при овоцитите от зародишните гнезда (Griffin et al., 2006). Събитията по време на формирането на примордиалните фоликули са критични, тъй като тези фоликули съставляват репродуктивните единици на яйчника и ще бъдат използвани през репродуктивния период.

Още на този ранен етап от развитието си примордиалните фоликули са заградени с базална мембрана от колаген тип IV. Тази базална мембрана осигурява структурна подкрепа за развиващите се в яйчника фоликули и поддържа клетъчната им организация (Heeren et al., 2015).

По време на разпадането на зародишните гнезда някои овоцити от всяко гнездо загиват чрез апоптоза. Смята се, че около две трети от изходния брой овоцити се елиминират по този начин (Pepling and Spradling, 2001). Явлението се наблюдава както при мишка (McClellan et al., 2003; Ghafari et al., 2007), така и при други бозайници, включително човек (De Pol et al., 1997). Ето защо в човешкия женски фетус броят на герминативните клетки нараства до около 20 гестационна седмица, но след това до раждането намалява (Byskov, 1986; Oktem and Oktay, 2008). Сигнал за апоптозата отново са Notch-молекули (Xu and Gridley, 2013). Когато една клетка от гнездото загине, то се разделя на по-малки гнезда. Това се повтаря, докато не останат няколко отделни овоцита. В крайна сметка само около една трета от изходното количество овоцити оцеляват. Броят им е видово-специфичен; при човека новороденото момиченце разполага с около един милион примордиални фоликули в яйчниците (te Velde et al., 1998).

Причините за масовата апоптоза на овоцити при разпадането на зародишните гнезда все още се изясняват. Много е вероятно на този етап да се провежда „качествен контрол“ на овоцитите и клетките, показали дефекти, да се елиминират. Установено е, че делът на загиналите чрез апоптоза овоцити се увеличава при нарушения на синапсиса и кросинговъра на хромозомите, както и при дефекти на митохондриите (Ghafari et al., 2007). Факт е обаче, че всички женски зародиши, дори тези с напълно нормални яйчници, губят голям процент от овоцитите си, което налага да се търсят и други причини. По данни на Bristol-Gould et al. (2006) „прочистването“ на фоликулите има и функцията броят им да бъде намален до стойност, оптимална за размерите на яйчника. Неотдавна обаче е установено, че апоптозата на част от овоцитите е процес с удивителна еволюционна консервативност, сходен при *Drosophila* и бозайници, и има функцията да подпомогне растежа и диференцирането на оцелелите овоцити (Lei and Spradling, 2016; Chao and Niwa, 2016).

При насекомите от всички клетки в зародишното гнездо само една се развива като овоцит. Останалите стават помощни или изхранващи клетки (nurse cells) и подпомагат растежа на овоцита, като му прехвърлят цитоплазменото си съдържимо и митохондриите си през междуклетъчните мостове, след което загиват чрез апоптоза. Установено е, че при мишка междуклетъчните мостове между овоцитите в зародишните гнезда също могат да съдържат митохондрии (Pepling and Spradling, 2001; Tinggen et al., 2009). Това навежда на мисълта, че загиващите овоцити от зародишните гнезда на бозайниците подобно на изхранващите клетки при *Drosophila* вероятно подпомагат растежа на останалите овоцити, които оцеляват и впоследствие образуват фоликули. Хипотезата е потвърдена от неотдавнашни изследвания върху миши фетални яйчници (Lei and Spradling, 2016; Chao and Niwa, 2016). Оказва се, че във всяко зародишно гнездо една от клетките през цитоплазмените мостове получава от другите клетки апарат на Голджи и митохондрии. Това ѝ позволява да увеличи количеството на цитоплазмата си много по-бързо, отколкото е възможно чрез биосинтеза. По този начин клетката реципиент е програмирана да продължи развитието си като овоцит, докато останалите клетки в гнездото ще загинат. Така

транспортът на цитоплазмени органели от клетките в гнездото към клетката-реципиент допринася за увеличаването на нейните размери и ѝ помага да започне развитието си като бедещ овоцит. Благодарение на междуклетъчния транспорт през цитоплазмените мостове голяма част от клетъчната цитоплазма и органелите синтезирани по време на феталното развитие се запазват в първичните овоцити въпреки загиването на голям брой герминативни клетки (Chao and Niwa, 2016; Lei and Spradling, 2016).

### **2.1.3. Фоликулно активиране, зреене и атрезия**

След образуването си примордиалният фоликул първоначално е неактивен, т.е. намира се в покой и не търпи по-нататъшен растеж и развитие. Овоцитът му е „арестуван“ (спрян) на стадий dictyate от първата мейотична профаза, а гранулозните клетки не се делят и не променят формата си. Под влияние на хормонални и паракринни сигнали обаче примордиалният фоликул може да се активира, т.е. да възобнови фоликулогенезата и да премине към следващите ѝ етапи.

Размножаването изисква овоцитът и целият фоликул да осъществят растеж и развитие, което в крайна сметка да доведе до отделяне на овоцита от фоликула – овулация. Етапите на фоликулогенезата от активирането до овулацията общо се наричат фоликулно зреене. При това примордиалният фоликул нараства и последователно се преобразува в първичен, вторичен, антрален и преовулаторен (граафов). На фоликулното зреене съответства мейотично зреене на овоцита, който възобновява мейозата си и от dictyate на профаза I стига до метафаза II към момента на овулацията (второто мейотично делене завършва само ако настъпи оплождане). Съвсем не винаги обаче активирането и зреенето стигат до този успешен край. По-голямата част от фоликулите загиват, преди да завършат зреенето си. Този процес се нарича фоликулна атрезия. При човека по време на целия репродуктивен период до овулация узряват около 400 фоликула, докато атрезия търпят около 200 000. При това фоликулната атрезия става по-изразена в последните години преди менопаузата (Townson and Combelles, 2012).

Примордиалните фоликули съставляват репродуктивния резерв на женските бозайници. При бозайниците съществуват две „вълни“ на активиране на фоликулите в зависимост от възрастта – преди или след настъпване на пубертета. На тях отговарят две популации от примордиални фоликули, които проявяват различна динамика в развитието си през различните периоди от постнаталното развитие (Zheng et al., 2014). Първата вълна на активиране се наблюдава в сърцевинната зона на яйчника. Намиращите се там примордиални фоликули се активират спонтанно и почти синхронно скоро след като бъдат формирани по време на феталното развитие при човек и други примати (Peters et al., 1978), съответно по време на ранното постнатално развитие при гризачи (Hirshfield, 1992; Hirshfield and DeSanti, 1995; Byskov et al., 1997). При мишка сърцевинните примордиални фоликули 2-5 дни след раждането започват да нарастват, след което зреят и образуват ранни антрални фоликули 2-3 седмици след раждането. Това отговаря на предпубертетния период, доколкото пубертетът при различните миши линии настъпва на възраст между 4 и 8 седмици. Описаната медуларна популация от рано зреещи фоликули осигурява първата овулация по време на пубертета и последващите овулации през първите два месеца от живота на мишката (Zheng et al., 2014).

При човека, който се характеризира с много по-бавно развитие и късно достигане на репродуктивна зрялост, фоликулите от първата (медуларна) вълна през периода на детството се активират и зреят до антрален етап (Peters et al., 1976). Смята се обаче, че всички те търпят атрезия, преди да стигнат до овулация (Albamonte et al., 2013). Веднъж започнали да зреят, те не могат да „изчакат“ пубертета, който при човека настъпва късно, а хормоналната среда на предпубертетния яйчник е неподходяща за късните етапи на фоликулното зреене.

В кортикалната зона на яйчника, обратно, примордиалните фоликули дълго време остават неактивни. Те започват да се активират едва с настъпването на пубертета под хормонален стимул и контрол. Гранулозните клетки посредством рецепторите си получават хормоналния стимул за начало на овоцитното зреене, идващ от хипоталамуса и хипофизата под формата на

гонадотропни хормони (McGee & Hsueh, 2000). За разлика от фоликулите от първата вълна кортикалните фоликули не се активират синхронно, а на групи (кохорти) при всеки естрален, съответно менструален цикъл. Периодичното им зреене обезпечава овулациите от около 2-3 месечна възраст до края на репродуктивния живот на мишките (Zheng et al., 2014; Gaytan et al., 2015), а при човека – през целия репродуктивен период от пубертета до менопаузата (Albamonte et al., 2013).

В примордиалните фоликули мишите овоцити са сравнително малки (диаметър 12-15  $\mu\text{m}$ ) и са заобиколени от единичен слой плоски гранулозни клетки. Овоцитът и гранулозните клетки са свързани с цепковидни контакти, които са необходими за фоликулогенезата и овоцитното зреене (Teng et al., 2016). През цепковидните контакти овоцитът осъществява комуникация с гранулозните клетки и те го снабдяват с енергийни субстрати, нуклеотиди и аминокиселини. Двата типа клетки обменят и сигнални молекули, чрез които координират своето диференциране. В това отношение освен нискомолекулните съставки, преминаващи през цепковидните контакти, важна роля имат и паракринни фактори като лиганда на c-kit (Eppig et al., 1996; Yoshida et al., 1997).

Оставането на примордиалния фоликул в покой и активирането му се регулират прецизно, за да се постигне равновесие между тези два процеса и да се обезпечи наличие на зреещи овоцити през целия репродуктивен период. Определени транскрипционни фактори, експресирани в периода на покой, предотвратяват спонтанното активиране на овоцита и на целия фоликул. Чрез генно-инженерно манипулиране на мишки е установено, че липсата на тези инхибиращи фактори води до ранно всеобщо активиране на примордиалните фоликули и преждевременно изчерпване на яйчниковия резерв (Adhikari and Liu, 2009; Ren et al., 2015).

Фоликулното зреене включва промени както в овоцитите, така и в гранулозните клетки. След активацията на примордиалния фоликул гранулозните клетки отначало остават подредени в единичен слой, но променят формата си в кубична. Такъв фоликул вече се нарича първичен. Овоцитите в първичните фоликули започват да натрупват РНК и протеини, с което

диаметърът на клетката нараства значително, макар че мейозата ѝ още е спряна в dictyate. Започва синтезата и на гликопротеини за zona pellucida (Eppig et al., 1996; Liang et al., 1997; Townson and Combelles, 2012).

Следващият етап от фоликулното зреене се характеризира с пролиферация на гранулозните клетки, водеща до подреждането им в два и впоследствие в няколко слоя. С това фоликулът става вторичен или преантрален. Овоцитите във вторичните фоликули при мишка продължават растежа и възобновяват мейозата си. Те активно синтезират и секретират гликопротеини и изграждат своята прозрачна (блестяща) обвивка – zona pellucida. За да запазят тясната си връзка с овоцита, гранулозните клетки образуват дълги тънки израстъци, пронизващи зоната, и чрез тях продължават да му осигуряват хранителни вещества и химични сигнали. Междувременно към базалната мембрана на вторичния фоликул отвън се присъединява нова популация от соматични клетки. Те образуват допълнителен слой, наречен тека. Докато гранулозните клетки експресират рецептори за фоликуло-стимулиращия хормон (FSH) на хипофизата, клетките на теката имат рецептори за другия гонадотропин – лутеинизиращия хормон (LH). Освен това те участват в синтезата на стероидни хормони и предизвикват васкуларизация на периферията на растящия фоликул, с което осигуряват кръвоснабдяването му (Young and McNeilly, 2010).

В по-нататъшния ход на фоликулното зреене между гранулозните клетки се натрупва извънклетъчна течност и се оформя цепковидна празнина (антрум), с което фоликулът се превръща в антрален. Гранулозните клетки, които продължават да се делят, се разцепват на две многослойни струпвания, свързани съответно с овоцита и с фоликулната базална мембрана. Първото струпване се нарича яйценосен хълм (cumulus oophorus), а многослойната обвивка, която по-вътрешните му клетки формират около овоцита – лъчист венец (corona radiata). Антралните фоликули са зависими от фоликуло-стимулиращия хормон – по-нататъшното развитие и самото преживяване на фоликула изисква FSH над определена прагова стойност. Ето защо отделните антрални фоликули от кохортата, зрееща през конкретния цикъл, се конкурират за FSH по време на фоликулната фаза на цикъла. Повечето от тях не успяват да се снабдят с

достатъчно количество от гонадотропина и претърпяват атрезия, изразяваща се в загиване на овоците и всички клетки във фоликула. Само сравнително малка част от антралните фоликули, наречени доминантни, оцеляват и преминават към заключителната фаза на фоликулното зреене – преовулаторен (граафов) фоликул. Броят на доминантните фоликули е видово специфичен и отговаря на обичайния брой формиращи се фетуси – при човека обикновено само един (Zeleznik and Hilier, 1996; Rimon-Dahari et al., 2016). В граафовия фоликул празнината е силно уголемена, а яйцеклетката е разположена ексцентрично, заобиколена от добре оформения cumulus oophorus (Eppig, 1996). С увеличаването на диаметъра си граафовият фоликул достига периферията на яйчника и изчаква сигнал за овулация.

В хода на описаните събития размерите на фоликула се увеличават 200 до 400 пъти (при човек от 50  $\mu\text{m}$  до 10 000 – 20 000  $\mu\text{m}$ , а при мишка – от около 15  $\mu\text{m}$  до около 300  $\mu\text{m}$ ). Същевременно диаметърът на овоците нараства 6 до 10 пъти: при човека от 15-20  $\mu\text{m}$  до 130-150  $\mu\text{m}$ , а при мишка – от около 12  $\mu\text{m}$  до около 80  $\mu\text{m}$ , които се достигат на етап антрален фоликул (Eppig, 1996; Zeleznik and Hilier, 1996).

Хормоналният сигнал за настъпването на овулация е рязко покачване на концентрацията на ЛН. След отделянето на зрелия ооцит заедно с кумулуса останалите соматични клетки от разкъсания фоликул търпят крайна диференциация и образуват жълто тяло (corpus luteum). През лутеиновата фаза на цикъла то секретира прогестерон, необходим за настъпването на бременност след евентуално оплождане (Rimon-Dahari et al., 2016).

#### **2.1.4. Нарушения в овогенезата и фоликулогенезата при синдром на поликистозните яйчници**

Сложността на овогенезата и фоликулогенезата при бозайниците и необходимостта от прецизна регулация на всеки етап прави тези процеси уязвими спрямо редица фактори, които могат да се намесят и да нарушат нормалния им ход. В резултат настъпват смущения във функцията на яйчника, които се отразяват на хормоналното равновесие в организма и понижават

фертилитета. Важно място сред тези патологични състояния заема синдромът на поликистозните яйчници или PCOS (polycystic ovary syndrome).

Синдромът на поликистозните яйчници (PCOS от polycystic ovary syndrome) е ендокринно заболяване, сравнително често сред жените в репродуктивна възраст и засягащо най-малко 12% от жените в репродуктивна възраст, като много от случаите остават недиагностицирани (March et al., 2010; Boyle and Teede, 2012). PCOS се характеризира с повишено съдържание на андрогени, често с видими изражения (акне, увеличено окосмяване), нередовна менструация и овулация, наличие в единия или двата яйчника на множество малки кисти, представляващи неовулирани антрални фоликули, понижен фертилитет и в редица случаи – инсулинова резистентност и наднормено тегло. Олигоменореята, хиперандрогенизмът и поликистозните яйчници са диагностични критерии, като при изпълнение на два от тях се приема наличие на PCOS. Първопричините за синдрома все още не са изяснени и се предполага, че той има генетична основа (Лазаров и сътр., 2016). По-голямата част от смущенията в овулацията при жени в репродуктивна възраст се дължат на PCOS. Смята се, че той е причина за около 10% от случаите на безплодие при жените (Wang and Alvero, 2013; Ben-Schlomo and Younis, 2014).

Пониженият фертилитет при PCOS е резултат от смущенията в ендокринната система (Shayya and Chang, 2010). Нарушава се синхронът между хипоталамуса и хипофизата, което е съпроводено с увеличена секреция на лутеинизиращ хормон и високо съотношение LH : FSH. В резултат се смущава взаимодействието на овоцитите с гранулозните клетки и се повишава производството на андрогени от клетките на теката, които силно се влияят от LH. Повишава се и образуването на инсулин, което води до инсулинова резистентност (Maurya et al., 2014). Излишъкът на андрогени нарушава метаболитния път на синтезата на стероидни хормони, което от своя страна води до абнормална фоликулогенеза, невъзможност да се „избере“ доминантен фоликул и оттам липса на овулация (Bakhshalizadeh et al., 2017). Ролята на андрогените за развитието на PCOS се потвърждава от изследвания, при които подобна патология се предизвиква експериментално при животински модели

чрез третиране с андрогени и техни аналози (Walters, 2016). Вероятно за нарушенията във фоликулогенезата допринася и анти-мюлеровият хормон, който се секретира от клетките на теката и показва повишено ниво при поликистоза (Bhide and Homburg, 2016). Все още е спорно доколко поликистозата изисква хормоналната среда да е нарушена още при ранното развитие на яйчника и дали повишеното ниво на андрогени във възрастно състояние може да индуцира PCOS. Изследвания върху транссексуални пациенти с анатомичен женски пол показват, че преди каквото и да е външно хормонално третиране симптоми на PCOS проявяват 50-60% от тях (Balen et al., 1993; Baba et al., 2007), а лечението с високи дози андрогени по желание на пациентите, изглежда, не повишава значимо честотата на поликистозата (Ikeda et al., 2013; Caanan et al., 2017). Тези данни подкрепят схващането, че PCOS се дължи на фактори, действащи преди настъпването на пубертета.

Поликистозният яйчник се отличава с характерна морфология. Той е уголемен в различна степен и има повишен брой антрални фоликули в сравнение с нормалния (Rotterdam ESHRE / ASRM-sponsored PCOS workshop group, 2004). Броят на първичните и вторичните фоликули също е повишен, докато броят на примордиалните фоликули не се различава съществено от този в нормалния яйчник. Най-вероятната причина за описаните отклонения е понижено ниво на фоликулна атрезия в поликистозния яйчник. Тази хипотеза се подкрепя от опити с култивиране на проби от биопсия на яйчници, при което фоликулите от пациентки с поликистоза показват значително по-добра преживяемост (Webber et al., 2007).

Относно морфологията и функционалната годност на самите овоцити от поликистозния яйчник данните са противоречиви. Sigala et al. (2015), след като провеждат оплождане *in vitro* при близо 100 жени с поликистоза на яйчниците, не установяват влошени показатели на техните овоцити в сравнение с тези от пациентки без поликистоза. Eini et al. (2017), напротив, установяват увеличен процент на овоцитите с абнормална морфология при андроген-индуциран миши модел на PCOS. Интересни данни съобщават Jia et al. (2016), които изследват модел на овариална поликистоза при свиня. Те откриват в овоцитите нарушения,

свързани с митохондриите: абнормално вътреклетъчно разпределение на тези органели, деформации в структурата им, понижен митохондриален мембранен потенциал, понижен брой копия на митохондриалната ДНК, повишено ниво на метилирането й и (може би като последица) понижена експресия на митохондриалните гени. Противоречивите данни за състоянието на овоцитите при PCOS подчертават необходимостта от по-обстойни изследвания в тази посока.

## **2.2. Асиметрия и полярност на овоцитната цитоплазма**

### **2.2.1. Цитоплазмена сегрегация при животни, различни от плацентните бозайници**

Асиметрия наричаме явлението, при което определени клетъчни компоненти са неравномерно разпределени. Тя може да бъде случайна и променлива и тогава е без съществено значение. Когато обаче асиметричното разпределение на органели и/или молекули е свойствено на всички клетки от дадения тип и промяната му води до нарушаване на функциите на клетката, се говори за клетъчна полярност (Kloc et al., 2008). Отдавна е известно, че при многоклетъчните животни извън плацентните бозайници овоцитите са поляризирани – имат анимален и вегетативен полюс. Причината е, че при тези животни действат два механизма за определяне на съдбата на зародишните клетки: не само ембрионална индукция, а и автономно детерминиране на бластомерите, т.е. независимо от клетъчното им микрообкръжение. Това автономно детерминиране се извършва посредством избирателно включване в цитоплазмата на различни морфогенетични детерминанти, т.е. регулаторни белтъци и кодиращи ги мРНК. За да определят различни пътища на диференциране за различните зародишни клетки, тези морфогени образуват в цитоплазмата на зиготата струпвания и градиенти, които могат да се оформят окончателно при оплождането, но обикновено се залагат още в овоцита при овогенезата. С други думи, за многоклетъчните животни с изключение на

плацентните бозайници създаването на асиметрия и полярност в овоцита е абсолютно необходимо условие за нормално зародишно развитие (Gilbert, 2000).

Когато е силно изразено, детерминирането чрез градиенти от морфогени води до т. нар. мозаично развитие. При него зародишът може да се разглежда като мозайка от клетки, всяка от които следва своя автономна програма, предопределена от включения в цитоплазмата ѝ набор от морфогени, и слабо взаимодейства със заобикалящите я клетки. При мозаично развитие отстраняването на бластомер води до дефект у зародиша – липса на определена структура, която е трябвало да се развие от дадения бластомер. Разделянето на ранен зародиш на две води не до развитие на два индивида (еднояйчни близнаци), а до два „полузародиша”, всеки от които поради липса на множество органи е нежизнеспособен (Gilbert, 2000). При мнозинството от животните определянето на плана на тялото, органогенезата и хистогенезата се направляват чрез цитоплазмена сегрегация и ембрионална индукция, изразени в различна степен, и съответно развитието е съчетание от регулативно и мозаично.

При нематодите цитоплазмената сегрегация е много по-изразена от ембрионалната индукция, поради което те са класически пример за мозаично развитие. Броят соматични клетки от всеки тип на всеки етап от развитието при нематодите е строго определен и за биологичния модел *Caenorhabditis elegans* е известен с точност до клетка. Деленията на бластомерите са асиметрични и всеки път дават голяма соматична и малка герминативна клетка. Герминативната клетка дължи своята тотипотентност на струпвания от морфогени, наречени Р-гранули, които предварително са съсредоточени в единия полюс на майчината клетка, за да попаднат на правилното място след деленето (White and Strome, 1996; Rose and Gönczy, 2014). Макар че нематодите са краен пример за мозаично развитие, техният модел за детерминиране на герминативните клетки се открива и при много други групи животни. Например при *Drosophila* в задния полюс на яйцето се съсредоточават т. нар. полярни гранули, съдържащи белтъка Vasa – морфоген, детерминиращ включилите го клетки да запазят тотипотентността си и да станат герминативни (Okada, 1998). При жабата *Xenopus* аналогични гранули, наречени зародишни, се съсредоточават във вегетативния полюс,

където впоследствие ще се обособят първичните полови клетки (Tada et al., 2016). Полярните, Р- и зародишните гранули често се означават с общото име „зародишни гранули“ или „зародишна плазма“ (Ikenishi, 1998).

Обобщените данни за различните групи животни (без плацентните бозайници) разкриват двойко значение на овоцитната полярност. Първо, анимално – вегетативната асиметрия на яйцето предопределя дорзо-вентралната асиметрия на зародиша. Второ, локализираните близо до вегетативния полюс на яйцето зародишни гранули детерминират клетките, произлезли от този участък, да запазят тотипотентността си и да станат герминативни (Elkouby et al., 2016).

### 2.2.2. Телце на Балбиани

В примордиалните фоликули на бозайниците се среща структура, открита преди повече от сто години в овоцити на различни гръбначни животни и наречена телце на Балбиани. То е преходен комплекс от органели, включения и молекули, който се намира в съседство с профазното ядро на първичния овоцит. Основните органели, участващи в образуване на телцето, са ендоплазмен ретикулум, апарат на Голджи и митохондрии, често наричани „митохондриален облак“. Освен това то съдържа белтъци и (поне в повечето случаи) мРНК. Когато овоцитът съдържа зародишни гранули, те също са съсредоточени в телцето на Балбиани (Marlow, 2010).

Разгледано във филогенетичен план, телцето на Балбиани е характерно главно за овоцитите на видове, които запасяват голямо количество жълтък в яйцата си – насекоми, риби, земноводни, птици. Присъствието на струпване на органели с асиметрична позиция спрямо ядрото е предмет на многобройни изследвания при животни с ясна цитоплазмена полярност като *Drosophila*, жаби и риби и е свързан в създаването на полярност в техните овоцити (Kloc et al., 1998; Cox and Spradling, 2003; Gupta et al., 2010).

Овоцитите на плацентните бозайници не показват видими градиенти и полярност. Независимо от това, преходен перинуклеарен комплекс от цитоплазмени органели, явно съответстващ на телцето на Балбиани, присъства в овоцити от примордиални фоликули на бозайници. За пръв път е наблюдаван

още през 60-те години на XX в. (Hertig and Adams, 1967). Този комплекс включва цистерни от апарата на Голджи, заобиколени от ендоплазмен ретикулум и митохондрии. Освен това телцето съдържа протеини, но засега не е установено натрупване на мРНК (Billett and Adam, 1976; de Smedt et al., 2000; Kloc et al., 2004, 2008; Pepling et al., 2007).

Структурата и съставът на телцето на Балбиани показват известни разлики при отделните групи животни. Например зародишните гранули, толкова характерни за яйцата на насекомите и теллециталните яйца на низшите гръбначни, липсват при бозайници (Marlow, 2010). При земноводни и риби в телцето на Балбиани се натрупват и мРНК, което не е установено в овоцитите от бозайници. Въпросът обаче още не е решен, доколкото в телцето на Балбиани при бозайници неотдавна е открит белтъкът Trailer hitch, участващ в регулацията и метаболизма на запасени мРНК (Pepling et al., 2007). Струпването на митохондрии при бозайници не е толкова плътно, колкото при низши гръбначни, а има вида на рехав облак (Kloc et al., 2008). Все още е спорно дали телцето на Балбиани при бозайници натрупва белтъка DDX4/Vasa. Някои автори установяват равномерно разпределение на тази РНК-хеликаза в цялата овоплазма още при ранните овоцити (Pepling et al., 2007), докато други я локализируют в телцето на Балбиани при овоцитите от примордиалните фоликули и в по-широки области от цитоплазмата при овоцитите от първичните фоликули (Albamonte et al., 2013).

Етапите от овогенезата, в които се наблюдава телцето на Балбиани, са сходни при различните систематични групи. Според повечето автори то за пръв път се открива в ранните овоцити, макар че има отделни съобщения за залагането му още в овогонииите (Takeva, 1976). При риби и жаби телцето, след като се образува в първичните овоцити, се разпада, когато яйцето достигне 1/4 до 1/3 от крайния си диаметър и образува кортикалните си гранули – т. нар. втори етап на овогенезата (Marlow and Mullins, 2008; Marlow, 2010). При бозайници телцето се наблюдава в първичните овоцити и присъства в примордиалните фоликули. В яйчиците на новородени мишлета телцата на Балбиани са ориентирани към цитоплазмените мостове между ранните овоцити

(Pepling et al., 2007; Kloc et al., 2008). В зреещите овоцити митохондриите и ендоплазмения ретикулум се разпръсват, телцето на Балбиани загубва организирания си вид и изчезва (Pepling et al., 2007; Albamonte et al., 2013).

В редица изследвания е установена връзка на телцето на Балбиани с цитоскелетни структури. В ранни овоцити от риби и жаби образуването на телцето започва с агрегация на митохондрии и зародишни гранули около центрозомата. Има данни, че това става още на стадий зиготен, когато хромозомите са свързани в „букет“, който също взаимодейства с центрозомата през ядрената обвивка (Elkouby et al., 2016). Компонентите на телцето на Балбиани се свързват с центрозомата в близост до цитоплазмените мостове, свързващи дъщерните клетки. На по-късен етап телцето се ориентира към вегетативния полюс (Kloc et al., 2004). При овоцити от ранни примордиални фоликули на бозайници ултраструктурни изследвания сочат асоциация на телцето на Балбиани с центрозомата (Петков, 1988). В яйчници на новородени мишки, където профаза I на мейозата е все още в ход, компоненти на телцето на Балбиани са свързани с центрозомите на овоцитите в първичните фоликули (Kloc et al., 2008). Възниква въпросът как телцето на Балбиани може да продължи да съществува и след навлизането на овоцита в dictyate, когато клетката остава без центрозома. В овоцити от риби и земноводни е открит белтък от групата на амилоидните белтъци, чийто прионоподобен домен го прави склонен да агрегира. Този белтък при рибата данио е наречен Bucky ball, а при *Xenopus* – xvelo. Натрупва се в телцето на Балбиани, където „слепва“ митохондрии и мРНК в общ агрегат (Voke et al., 2016). По този начин телцето на Балбиани може да се запази и след разпадането на центрозомата.

Установено е също, че интермедиерните филаменти колокализират с телцето на Балбиани, особено в овоцити от амниоти. Едно скорошно проучване на птичи яйца (от японски пъдпъдък, *Coturnix japonica*) показва наличието на виментин и цитокератин 5 в агрегатите от митохондрии в телцето (Rodler and Sinowatz, 2013). При човека присъствието на цитокератин 19 в овоцити е установено в единичен перинуклеарен агрегат (Santini et al., 1993), който вероятно съответства на телцето на Балбиани.

Присъствието на телцето на Балбиани в толкова много животински видове подсказва важни функции на тази структура в овогенезата. Изследвания на редица колективи показват, че телцето участва в транспорта на мРНК към вегетативния полюс на яйцата на риби и земноводни, както и в сегрегацията и съхранението на важни регулаторни протеини и кодиращите ги мРНК (Kloc и Etkin, 1995; Kloc et al., 1996, 2001, 2004; Wilk et al., 2005). Такива са някои майчини мРНК (*vasa*, *nanos*, *gasz*, *dazl*), локализирани в телцето на Балбиани при овоцити на риби и жаби и необходими за последващото развитие на ембриона (Marlow, 2010). В овоцити на данио с мутация на гена *bucky ball* телце на Балбиани не се образува, а набор от мРНК, които нормално се насочват към вегетативния полюс, се разпределят равномерно в целия обем на цитоплазмата (Marlow and Mullins, 2008). Това показва морфогенетичната функция на този преходен органелен комплекс поне в мезолецитални и телолецитални яйца.

За разлика от рибите и земноводните бозайниците имат изолецитални яйца. Въпреки асиметричната позиция на вретеното, те нямат специфично натрупване на жълтък и градиенти от морфогени и ролята на телцето на Балбиани в тях засега е неизвестна. Запазването на структура обаче обикновено предполага и запазване на функция. В това отношение следва да се отбележи, че някои от авторите, които съобщават за диференциране на овоцити от стволови клетки в яйчници на възрастни бозайници, откриват в тези новообразувани герминативни клетки телце на Балбиани (Parte et al., 2014). Други автори обаче свързват телцето на Балбиани с разпадането на зародишните гнезда и виждат в тази връзка една от причините овогенезата *de novo* от стволови клетки да бъде твърде малковероятна във възрастен яйчник. Според техни неотдавна публикувани данни телцето е резултат от транспорта на органели (митохондрии, апарат на Голджи) през междуклетъчните мостове в зародишните гнезда (Chao and Niwa, 2016). Необходими са още изследвания, за да се решат противоречията около тази „реликтна” структура на ранните овоцити от бозайници.

## **2.3. Разпределение на избрани компоненти на овоцита по време на овогенезата**

### **2.3.1. Разпределение на цитоскелетните елементи**

Микрофиламентите, микротубулите и интермедиерните филаменти са трите основни цитоскелетни елемента при гръбначните животни. Всички те присъстват в овоцита и търпят преобразувания в хода на овогенезата.

#### **Микротубули и техни организационни центрове. Роля на PCM-1**

Микротубулите се изграждат чрез спирално подреждане на димери от алфа- и бета-тубулин. Те определят общата форма на клетката и поддържат полярността ѝ (Alberts et al., 2008). Освен това чрез моторни белтъци от кинезиновото и динеиновото семейство микротубулите осъществяват транспорт на различни мембранни органели в интерфазната клетка, а по време на митоза и мейоза отговарят за движението на хромозомите.

Изграждането (нуклеацията) на всяка микротубула изисква гама-тубулинов пръстенен комплекс, върху който започват да се присъединяват алфа-бета тубулиновите димери. Всяка структура, съдържаща гама-тубулин в активна форма, е способна да нуклеира микротубули и затова се нарича микротубулен организационен център (MTOC от microtubule organizing center). Типичните животински клетки съдържат един голям MTOC – центрозомата, състояща се от двойка центриоли и заобиколящ ги облак от перицентриолен материал. Центрозомата се удвоява по същото време като ДНК, т.е. през S-периода на интерфазата, но двете дъщерни центрозоми остават сближени и функционират като едно цяло до началото на профазата. Удвояването става чрез изграждане на нова (дъщерна) центриола перпендикулярно на всяка от майчините. Центриолите съдържат гама-тубулин, но не нуклеират пряко микротубули освен при образуване на осев апарат на ресничка или камшиче. Перицентриолният материал съсредоточава основната част на гама-тубулина на клетката и именно той нуклеира цитоплазмените микротубули (Schnackenberg, 1998).

Сравнен с центриолите с тяхната строга и симетрична подредба на микротубули, перицентриолният материал изглежда аморфен, но системните изследвания в последно време разкриват сложна структура. Освен гаматубулиновите пръстенни комплекси перицентриолният материал съдържа и други надмолекулни комплекси, някои от които подпомагат нуклеацията на микротубули, а други са нужни за самото поддържане на центрозомата. Към последните спадат т. нар. центриолни сателити – микроскопични електроннопълтни гранули, които се съсредоточават около центрозомите. Те съдържат многобройни белтъци, участващи в поддържането на центрозомата, транспорта на белтъци към нея и регулацията на функциите ѝ (Tollenaere et al., 2015). Един от компонентите им е белтъкът РСМ-1 (или РСМ1; означението идва от “pericentriolar material”). При извличане или инактивиране на РСМ-1 нуклеацията на микротубули се запазва, но се нарушава радиалната им организация, както и центрозомната локализация на други важни белтъци като центрин и перицентрин (Dammermann and Merdes, 2002). На организмово равнище мутациите в гена за РСМ-1 имат доминантно действие, засягащо структурата и функциите на мозъка и обяснимо с важноста на правилно организирани микротубули за изграждането и поддържането на аксоните (Zoubovsky et al., 2015). По време на митоза РСМ-1 се отделя от центрозомите, разпределя се равномерно в цитоплазмата и видимо изчезва (Kubo and Tsukita, 2003; Lopes et al., 2011) или поне търпи известно разпръскване около полюсите (Bärenz et al., 2013). Намалява и самото количество на белтъка, тъй като експресията на гена му е изразена през G1 и S-фазата на клетъчния цикъл, но спада до почти нулево равнище през G2 и M-фазата (Balczon et al., 1995). Наличието и локализацията на РСМ-1 по време на овоцитната мейоза и изобщо на овогенезата засега са слабо проучени. В ранни профазни овоцити от новородени мишлета РСМ-1 е локализиран на обичайното си място около все още съществуващите центриоли (Kloc et al., 2008), а функционални изследвания с инжектиране на антитела срещу този белтък в пронуклеарни зиготи показват, че той е важен за правилното протичане на клетъчния им цикъл (Balczon et al.,

2002), но в известната ни публикувана литература липсват данни за организацията му между тези два етапа.

Микротубулите на незрелия овоцит в ранна профаза I отговарят за разположението и транспорта на органелите – митохондрии, ендоплазмена мрежа, комплекс на Голджи (Townson and Combelles, 2012). Центрозомата е разположена в съседство с ядрото. Проучвания върху сперматоцитна мейоза сочат, че на този етап (ранна профаза I) къси микротубули, излизащи от центрозомата, осъществяват през ядрената обвивка контакт с хромозомите и подпомагат техните движения (Shibuya et al., 2014). Има данни, че подобен механизъм действа и в ранните профазни овоцити (Elkouby et al., 2016). Освен това голяма част от транспорта на органели през междуклетъчните мостове се основава на микротубулите (Lei and Spradling, 2016).

Впоследствие овоцитът губи центрозомата си и центриолите му изчезват като микроскопски обекти. Молекулните основи на това явление засега остават неизвестни. Точният етап, в който то настъпва, показва известни разлики при различните видове, но най-често е непосредствено след стадий пахитен. Центриолите се разрушават, а гама-тубулинът се включва в двойка характерни структури, наречени мултивезикулни агрегати. Те не нуклеират микротубули, което показва, че съдържащият се в тях гама-тубулин е в неактивно състояние (Calarco, 2000; Manandhar et al., 2005). Електронно-микроскопски наблюдения върху човешки яйчници показват, че в овоцитите, намиращи се в първичните фоликули, центриолите вече отсъстват (Hertig and Adams, 1967). Малко след елиминирането на центрозомата диплотенът преминава в dictyate и мейотичното делене спира (Luksza, 2013).

Възобновяването на мейозата изисква повторно формиране на вретеното. В овоцитите на гръбначните това става чрез разпадане на мултивезикулните агрегати и съсредоточаване на гама-тубулина в множество малки микротубулни организационни центрове, които се разполагат около ядрото и функционално заместват центрозомите (Manandhar et al., 2005). След разпадането на GV перинуклеарните МТОСs в близост до хромозомите се активират и нуклеират микротубули (Luksza, 2013). Тези микротубули се удължават и се свързват с

различни моторни белтъци, с чиято помощ изграждат двуполусно мейотично вретено (Schuh and Ellenberg, 2007).

Многобройните малки МТОС на овоцита за разлика от центрозоите не образуват астрални микротубули през метафазата и това допринася за намаляване на размера на полярното телце (Verlhac et al., 2000). Ето защо елиминирането на центрозоите по време на овогенезата може да се разглежда като стратегия за осигуряване на асиметричното разделяне и получаване на голяма яйцеклетка, годна за оплождане. Освен това липсата на центрозоми в овоцита силно намалява шанса за партеногенеза и така спомага за осъществяване на оплождането и нормално начало на зародишното развитие.

### **Микрофиламенти**

Микрофиламентите са изградени от фибриларен актин (F-актин) и играят роля в набор от жизнени процеси – поддържане на клетъчната мембрана, мембранен транспорт, органелен транспорт, цитокинеза, клетъчна миграция, клетъчна адхезия, мускулно съкращение. Много от тези процеси са зависими от динамиката на микрофиламентите, което включва полимеризация и деполимеризация на актиновите нишки (Welch, 1997). В клетките се съдържа известно количество нефиламентен или глобуларен (G-) актин, което дава възможност за бързо реорганизиране до F-актин. Нови микрофиламенти се нуклеират с посредничеството на специализирани белтъци *de novo* или (почесто) като разклонения на съществуващи вече микрофиламенти.

През овогенезата микрофиламентите изпълняват важни функции. Те присъстват в телцето на Балбиани в ранни овоцити от земноводни (Zelenka et al., 1992) и риби (Escobar-Aguirre et al., 2017). За овоцити от бозайници на този ранен етап обаче липсват данни в известната ни литература.

В по-късните етапи от овоцитната мейоза, както и изобщо при деленето на животинските клетки, микрофиламентите са отговорни за цитокинезата. Около екватора на телофазното вретено се образува актинов пръстен, който, стеснявайки се, отделя полярното телце от овоцита (Делимитрева, 2010; Delimitreva et al., 2012). В действителност участието на актина е необходимо още по-рано, доколкото асиметричната цитокинеза изисква периферно разположение

на мейотичното вретено. Именно микрофиламентите изтеглят вретеното в периферията на овоцита и го закотвят под клетъчната мембрана (Brunet and Verlhac, 2011).

В овоцити от бозайници на стадий зародишно мехурче (GV) актиновите нишки се съсредоточават в тънък еднороден слой в клетъчната периферия и в перинуклеарната област. Кортикалният слой микрофиламенти има сходна структура при овоцити от различни бозайници – мишка, свиня, говедо, човек (Sun and Schatten, 2006). Мрежа от актинови филаменти обгръща и герминалния везикул. Има данни, че още в ранните стадии на профаза I актиновата мрежа, заобикаляща ядрото, подпомага хроматиновите преобразувания в него (Koszul et al., 2008). По време на овоцитното зреене актинови филаменти свързват герминалния везикул с кортекса и вероятно са отговорни за неговото центриране, като упражняват противоположни сили (Kloc et al., 2012). След разпадането на ядрената обвивка микротубулите остават тясно свързани с микрофиламентите. В резултат на тези процеси след разпадането на герминалния везикул микрофиламентите като цяло запазват вътреклетъчното си разпределение и се наблюдават както в клетъчната периферия, така и около хроматина (Kim et al., 1998; Wang et al., 2000; Markova et al., 2015).

Актинът, заобикалящ мейотичното вретено, остава свързан с общата актинова мрежа, достигаща до клетъчната мембрана. В началото на метафаза I вретеното се намира в центъра на овоцита. Не след дълго обаче актиновата мрежа изтегля единия му полюс до най-близкия участък от клетъчната периферия. Процесът се нарича миграция на вретеното и е предпоставка за асиметричната цитокинеза (Azoury et al., 2009, 2011). Щом вретеното достигне периферията, над него се образува струпване от кортикални микрофиламенти, наречено актинова шапка. Тя закотвя вретеното под клетъчната мембрана и е отговорна за поддържането му в периферна позиция, докато яйцеклетката довършва първото си мейотично делене, отделя първото полярно теце и достигайки метафаза II, изчаква активиране при евентуално оплождане. В зрелите овоцити микрофиламентите се разполагат основно в областта на

актиновата шапка, покриваща вретеното (Zernicka-Goetz et al., 1993; Markova et al., 2015).

Важно значение за овогенезата има и актиновият цитоскелет на кумулусните клетки. Техни микрофиламенти служат като опора на израстъците им, които преминават през zona pellucida, навлизат в перивителинното пространство и се свързват със зреещия овоцит (Zhu et al., 2003; Markova et al., 2015).

### **Интермедиерни филаменти**

Интермедиерните филаменти (IF) са характерни за многоклетъчните животни. Белтъците им се делят на 6 типа според първичната структура: I тип (кисели кератини), II тип (основни и неутрални кератини), III тип (виментин, глиален фибриларен кисел белтък, десмин и периферин), IV тип (неврофиламентни белтъци и интернексин), V тип (ламини) и VI тип (нестин) (Gruenbaum and Aebi, 2014). Съставът на цитоплазмените IF зависи от типа на клетката. Най-разпространените и добре изучени белтъци на цитоплазмените IF са кератините (цитокератините) в епителните клетки и виментинът в клетките от мезенхимен произход. Формирането на различни видове интермедиерни филаменти е свързано с диференциацията на клетките, като подкласовете им служат като маркери за различните типове клетки. Тази тъканна специфичност позволява те да бъдат използвани за определяне на произхода на тумори (Moll, 1998; Strnad et al., 2012). IF са взаимосвързани с другите цитоскелетни системи, като в някои случаи актиновите филаменти направляват изграждането на кератиновите (Weber and Bement, 2002).

Кератините или цитокератините изграждат IF в епителните тъкани и са важни за механичната им устойчивост. При липса или променена структура на даден кератин клетките, които го експресират, стават склонни да се разкъсват при напрежение (Chiriev et al., 1994; Chamcheu et al., 2011). По време на овоцитното зреене кератинови филаменти се откриват в зреещите овоцити и в кумулусните клетки, където участват в поддържането на контактите с овоцита (Markova et al., 2015). Тези филаменти са и първият тип цитоплазмени IF, наблюдавани в ранния зародиш (Jackson et al., 1980).

Кератиновите филаменти, намиращи се в различни клетки от човешки яйчници, са изследвани чрез имунохистохимични методи. Santini et al. (1993) откриват кератин 8, 18 и 19 в човешки фетален и възрастен яйчник както в овоцитите, така и в гранулозните клетки и в повърхностния епителен слой. В овоцитите реакцията е съсредоточена в единичен перинуклеарен агрегат. Интензивността на реакцията за кератини в гранулозните клетки намалява по време на фоликулното зреене (Santini et al., 1993). Bukovsky et al. (2004) идентифицират цитокератин - положителния агрегат в овоцити от човешки примордиални фоликули с телцето на Балбиани. При мишка Appert et al. (1998) откриват същите три типа кератини (8, 18 и 19) в примордиалните фоликули на феталния и неонаталния яйчник. Впоследствие при зреенето на фоликулите кератин 19 вече не се открива, но кератини 8 и 18 присъстват на всички етапи на фоликулното развитие. Друга група изследователи (Löffler et al., 2000) съобщават за положителна реакция за цитокератини в гранулозните клетки на примордиалните и първичните фоликули, нейното изчезване в растящите фоликули и повторната ѝ поява в преовулаторните фоликули.

Plancha (1996) описва динамиката на цитокератиновите филаменти в зреещи хамстерови овоцити, където според него в края на профаза I (етап GV) кератините са съсредоточени в 4 до 10 големи агрегата в кортикалната цитоплазма. През метафаза I агрегатите се разпадат на многобройни малки струпвания и към метафаза II реакцията за кератин става почти хомогенна. Kabashima et al. (2010) получават подобни резултати, но на етап GV наблюдават освен кортикалните агрегати и фина мрежа от кератинови филаменти, която заобикаля плътно ядрото. Сходна локализация на цитокератини в хода на овоцитното зреене е описана при мишка от Wei et al. (2013).

Цитокератини са локализирани чрез специфични антители и в овоцити на други сухоземни гръбначни: жабата *Xenopus laevis* (Torpey et al., 1992; Gard et al., 1997) и гущера *Podarcis sicula* (Maurizii et al., 1997). При най-обстойно изучения обект – *Xenopus*, е установено, че кератиновият цитоскелет се организира през ранните етапи на овогенезата в кортикалната цитоплазма и около GV. В растящите овоцити той се разраства и поляризира, а към края на зреенето търпи

разпад (Gard et al., 1997; Clarke and Allan, 2003; Kloc et al., 2005). При влечугото *Podarcis* кератин се наблюдава в растящите овоцити като тънък кортикален слой, който става по-дебел към края на превителогенния растеж. Не са съобщени данни за по-късните етапи (Maurizii et al., 1997).

При предшестващи изследвания на нашия колектив върху зреещи миши овоцити е установена реакция за цитокератини в кортикалната и перинуклеарната област на стадий GV и в кортикалната област и около мейотичното вретено в метафазните овоцити (Markova et al., 2015). Така установената реакция за цитокератини съответства на установената в зреещи овоцити на земноводни и влечуги, което показва еволюционна консервативност на кератиновите структури в овогенезата и предполага съответно запазване на функциите им (Nikolova et al., 2016).

Друг важен белтък на цитоплазмените IF е виментинът, който се експресира в голямо количество в мезенхимните клетки. Заедно с микротубулите и микрофиламентите виментинът участва в изграждането на цитоскелета за поддържане на формата и целостта на клетката и подпомага взаимодействието на мезенхимните клетки помежду им (Eriksson et al., 2009).

Виментинът е свойствен на клетките, способни на самостоятелни движения и/или често изложени на механичен стрес (Mendez et al., 2014). Освен че е тъканно-специфичният белтък на IF в клетките от мезенхимен произход, той се експресира в набор от зародишни клетки, повечето клетъчни култури независимо от произхода им и редица метастазиращи тумори. Често култивираните клетки експресират виментин успоредно с друг белтък на IF, характерен за изходната им тъкан (Colucci-Guyon et al., 1994). Виментиновата мрежа се разполага най-вече около ядрото. Тази локализация обяснява защо виментиновите филаменти не „втвърдяват” съществено клетъчната периферия и са подходящи за подвижни и усилено делеящи се клетки, като същевременно повишават механичната устойчивост на цитоплазмата и стабилизират ядрото (Guo et al., 2013). Експресията на виментиновия ген се усилюва под действието на растежни фактори и при ремоделиране на тъканта, например при зарастване на рани (Rogel et al., 2011).

При имунохистохимични изследвания на яйчника за виментин е установена положителна реакция във фоликулните клетки. Епителни и гранулозни клетки от фетален и следпубертетен човешки яйчник показват коекспресия на виментин и цитокератини – съчетание, обичайно за култивираните клетки, но рядко наблюдавано *in vivo*. По време на фоликулното зреене количеството на цитокератините намалява, докато виментинът остава постоянен (Santini et al., 1993). Освен в соматичните клетки на яйчника някои автори установяват положителна реакция за виментин и в самия овоцит. Payne et al. (2003) съобщават, че в хода на оплождането при говедо и резус макаци виментинови филаменти образуват мрежа около пронуклеусите и специфично се свързват с една от субединиците на динактина – белтък, подпомагащ двигателната функция на динеина. Наши по-ранни изследвания върху зреещи миши овоцити установяват наличие на виментин и негова колокализация с цитокератините (Markova et al., 2015).

### **2.3.2. Разпределение на мембранните органели**

#### **Митохондрии**

В овоцитите от бозайници обикновено се съдържат около 100 000 митохондрии, които могат да заемат до 30% от цитоплазмата (Dumollard et al., 2006). Състоянието на тези митохондрии е изключително важно, доколкото те дават начало на всички митохондрии на бъдещия зародиш. Освен това митохондриите на яйцеклетката имат голямо значение за нейната ядрена и цитоплазмена зрялост, тъй като осигуряват аденозинтрифосфат (АТФ) по време на овоцитното зреене (Stojkovic et al., 2001). Повредените или негодни митохондрии и последващото ниско производство на АТФ е един от факторите с основно значение за качеството на яйцеклетките, както и белег на стареене на овоцитите (Marangos and Carroll, 2008; May-Panloup et al., 2016).

Отдавна е известно, че митохондриалната ДНК се унаследява от яйцеклетката, т.е. има майчин произход (Cummins et al., 1997). Майчините митохондрии, съответно митохондриалната ДНК, съдържаща се в яйцеклетката, се разпределя между всички дъщерни клетки по време на ембрионалното

развитие. До имплантацията митохондриалната ДНК не се реплицира, което прави овоцитите чувствителни към всякакъв тип нарушения, засягащи митохондриите. Ето защо митохондриалната дисфункция е един от факторите, които могат да повлияят неблагоприятно върху ембрионалното развитие (Spikings et al., 2007).

Изследванията върху разпределението на митохондриите в ранни профазни овоцити от примордиални фоликули на бозайници са все още оскъдни. Известно е, че в примордиални фоликули от мишка митохондриите участват в създаването на полярност в незрелите овоцити чрез асоциирането си с телцето на Балбиани като „митохондриален облак” (Kloc et al., 2008). Процесът на реорганизация на митохондриите и тяхното взаимодействие с останалите органи в овоцитите на стадий профаза I обаче остава слабо проучен.

Повече данни за разпределението на митохондриите в овоцитите от бозайници има за етапа на мейотичното зреене, протичащ в постпубертетния яйчник. На стадий GV митохондриите се разпределят в овоплазмата хомогенно или в малки агрегати. През периода между разпадането на GV и метафаза I при миши овоцити (преметафазен период) се наблюдава акумулиране на митохондриите в перинуклеарния регион (Van Blerkom, 1991). В хода на мейотичното зреене митохондриите се преместват кортикално към един от полюсите на вретеното, където правят струпване, което маркира мястото на отделяне на първото полярно телце. В зрелите овоцити митохондриите са разпределят предимно в полусферата на мейотичното вретено, като оставят централния район на клетката беден на митохондрии (Calarco, 1995).

Според наличните данни преразпределението на митохондриите се координира от промени в местоположението на микротубулните организационни центрове (Van Blerkom, 1991). Както перинуклеарното струпване на митохондрии в овоплазмата, така и последващата им дисперсия в овоплазмата най-вероятно се направлява от микротубулите (Sanchez et al., 2015); микрофиламентите, изглежда, нямат съществена роля в динамиката на митохондриалното разпределение през овогенезата (Yu et al., 2010; Takahashi et al., 2016).

## Апарат на Голджи

Апаратът (комплексът) на Голджи е централен органел на секреторния път, осъществяващ биохимична модификация, насочване и транспорт на набор от белтъци и липиди. В него новосинтезираните белтъци се подлагат на посттранслационни модификации и се разпределят за пренос към клетъчната повърхност или други мембранни органели (ендозоми, лизозоми, секреторни гранули) според нуждите на клетката. По този начин апаратът на Голджи стои в основата както на ендоцитозата, така и на екзоцитозата и е особено важен за образуването на извънклетъчния матрикс (Dacks et al., 2009).

Апаратът на Голджи е изграден от цистерни – сплеснати мембранни структури, сближени успоредно като пачка с определена подредба, означавана като „дис към транс“. Но макар да се открива в един или друг вид при всички еукариоти, структурата му до известна степен варира. Докато в клетките на гъби, растения и безгръбначни животни се съдържат отделни пачки от цистерни, в клетките на бозайниците тези цистерни през интерфазата са странично свързани с мембранни тръбички и образуват единна лентовидна мембранна система (Marra, 2007; Wilson et al., 2011). Установени са два белтъка, отговорни за свързването на цистерните в пачка и на пачките в лента. Те се означават като GRASP55 и GRASP65, където GRASP е акроним за Golgi ReAssembly Stacking Protein. И двата са периферни мембранни белтъци, които се разполагат откъм цитоплазмената страна на Голджи - мембраните и образуват олигомери, слепващи съседните цистерни (Zhang and Wang, 2016). Експерименталното лишаване на клетката от GRASP-белтъци води до разпръскване на пачките на Голджи до единични цистерни и тубуло - везикулни структури, ускорява транспорта на белтъците между клетъчните компартменти и нарушава гликозилирането на белтъци и липиди (Bekier et al., 2017).

В интерфазната клетка апаратът на Голджи се намира в близост до центрозомата. Това негово разположение се осигурява от микротубулите посредством моторни белтъци от семейството на цитоплазмените динеини (Yadav and Linstedt, 2011). По време на митоза органелът търпи коренна реорганизация. Наблюдения върху делящи се соматични клетки показват, че при

навлизането в митоза „лентата на Голджи“ се разпада първо до отделни пачки, а впоследствие до малки струпвания от мембранни тръбички и мехурчета, разпръсква се и остава в този вид до крайните стадии на деленето, като се възстановява малко преди завършването на цитокинезата (Ayala and Colanzi, 2016). По този начин се осигурява равномерното му разпределение в дъщерните клетки. Разпадането се дължи на фосфорилиране на GRASP-белтъците (Feinstein and Linstedt, 2016).

Изследвания в последно време показват, че разпадането на лентовидната структура до изолирани пачки е необходимо условие за преминаването през контролната точка G2 – M (Sutterlin et al., 2002). Това може би е свързано с факта, че някои белтъци, през интерфазата асоциирани с апарата на Голджи, по време на митозата се отделят от него и поемат специфични функции, свързани с организацията на делителното вретено и вретеновата контролна точка (Valente and Colanzi, 2015). Например матриксният белтък GM130, компонент на цис-Голджи системата, след като бъде фосфорилиран под контрола на активната циклин-зависима киназа (Racedo et al., 2012), се асоциира с вретеновите полюси (Payne and Schatten, 2003). Белтъкът TGN38, компонент на транс-Голджи системата, също се асоциира с полюсите на вретеното, но по друг механизъм, включващ взаимодействие с центрозомата (Takatsuki et al., 2002).

Както се спомена по-горе, мембрани от апарата на Голджи се пренасят по цитоплазмените мостове между клетките от зародишните гнезда, за да се натрупат в овоцитите, които ще преживеят и ще образуват фоликули. При *Drosophila* в транспорта им участват както микротубули, така и микрофиламенти (Nicolas et al., 2009). При бозайници процесът засега е слабо изучен.

В зреещите овоцити апаратът на Голджи изпълнява важни функции – участва в синтезата на гликопротеините на zona pellucida и образува кортикалните гранули, отговорни за трайното блокиране на полиспермията при оплождането. Към настоящия момент обаче динамиката на Голджи-мембраните по време на овогенезата при бозайници е слабо изучена. Овогониите притежават типичен за животинска клетка апарат на Голджи (Sathananthan et al., 2000). Той обаче търпи частична фрагментация при разрушаването на центрозомата след

стадий пахитен. В овоцитите, спрени в профаза I (стадий GV), апаратът на Голджи е представен във вид на изолирани пачки, които са относително равномерно разпределени в цитоплазмата със слабо изразено предпочитание към вътрешните ѝ области. След възобновяването на мейозата и разпадането на GV тези мембранни структури се фрагментират допълнително и се преразпределят, като се изместват към клетъчната периферия. Описаната реорганизация е важен елемент на цитоплазменото зреене на овоцита (Nyttel et al., 1986; Moreno et al., 2002; De los Reyes et al., 2012). Според някои автори при прехода към метафаза I мембраните на Голджи търпят ново преразпределение, като се преместват от кортекса към центъра на клетката (Racedo et al., 2012).

Фрагментацията и разпръсването на цистерните на Голджи по време на овоцитната мейоза са като цяло сходни с наблюдаваното през митозата. На молекулно ниво обаче се разкриват и разлики. Например, докато белтъкът TGN38 се колокализира с гама-тубулина и така запазва познатата си от митозата склонност да се концентрира в полюсите на вретеното (Chen et al., 2014), белтъкът GM130, който се свързва с вретеновите полюси в дялящите се соматични клетки, не се асоциира с мейотичното вретено на овоцита, което може да се обясни с липсата на центрозоми в полюсите му (Payne and Schatten, 2003). За локализацията на GRASP-белтъците в герминативните клетки липсват литературни данни.

Функциите на комплекса на Голджи по време на мейозата са изследвани чрез третиране на миши овоцити с гъбния токсин брефелдин А, който е инхибитор на свързания с Голджи везикулен транспорт. Ако третирането се извърши преди възобновяването на мейозата, овоцитното зреене се блокира и клетката остава на етап GV (Moreno et al., 2002). Ако инхибиторът бъде приложен, след като овоцитът вече е активиран за зреене, мейозата протича без нормалната миграция на вретеното към клетъчната периферия. То остава централно разположено до края на метафаза I, а също така и през метафаза II. В резултат деленето става симетрично и след цитокинезата се получават еднакви по големина клетки вместо овоцит и полярно телце (Wang et al., 2008). Аналогични последици има експерименталното премахване на гореспоменатия

компонент на транс-Голджи системата TGN38 чрез използване на РНК-интерференция (Chen et al., 2014). Тези данни сочат, че комплексът на Голджи изпълнява важни, макар и все още неизяснени регулаторни функции по време на овоцитната мейоза.

Прегледът на публикуваната специализирана литература показва, че незрелите овоцити от плацентни бозайници на ранен етап от своето диференциране (мейотичната профаза I, протичаща във феталния и при някои видове в неонаталния яйчник) показват белези на асиметрия и полярност, най-ясно изразени в образуването на телце на Балбиани. Наличните данни обаче оставят открит въпроса дали тази полярност е само субклетъчен реликт, останал от телолециталното амниотично яйце на далечния предшественик на бозайниците, или е структура с немаловажно значение за овогенезата. За да се реши този въпрос, най-напред са необходими данни за вътреклетъчното разпределение на набор от компоненти на овоцита на различни етапи от развитието му. По този начин може да се изясни как компонентите на телцето на Балбиани се организират по време на овогенезата и как взаимодействат помежду си. Въпросът е от голям общобиологичен интерес, понеже засяга овогенезата – процес с ключово значение за размножаването на многоклетъчните организми, и то в еволюционен аспект. Практически и етични съображения затрудняват системно изследване от такъв характер върху човешки яйчници и при всички положения налагат то да се проведе най-напред върху биологичен модел – мишка. При възможност обаче е желателно да се получат данни и за човешки овоцити, особено ако те позволяват да се хвърли светлина върху патология като поликистозата на яйчниците, която има многостранно отражение върху успеха на овогенезата и съответно върху фертилитета. Така изследването на компонентите на овоцита и тяхното вътреклетъчно разпределение добива отношение и към клиниката на едно заболяване с немалка обществена значимост.

### 3. Цели и задачи

#### Цели:

1. Визуализация на клетъчни компоненти с потенциална роля за създаване на асиметрия в цитоплазмата на овоцити от фетален и възрастен яйчник: мембранни органели (митохондрии, апарат на Голджи) и цитоскелетни структури (центриолни сателити, интермедиерни филаменти, микрофиламенти).
2. Установяване на корелации във вътреклетъчната локализация на различните клетъчни компоненти с отношение към полярността и тяхната динамика в хода на овогенезата.

В съответствие с поставените цели си поставихме следните задачи:

#### Задачи:

1. Изследване на овоцити от примордиални фоликули в яйчникови срези от пациентки с овариална поликистоза за евентуално наличие на полярност чрез имунофлуоресцентна локализация на набор от цитоскелетни белтъци.
2. Идентифициране на овоцити в срези от неонатален миши яйчник чрез имунофлуоресцентна локализация на маркер за герминативни клетки.
3. Изследване на разпределението и евентуалната колокализация на цитоскелетни белтъци и маркери на митохондриите и апарата на Голджи в перинуклеарната цитоплазма при герминативни клетки от формиращи се примордиални фоликули в овариални срези от новородени мишки.
4. Изследване на разпределението и евентуалната колокализация на цитоскелетни белтъци и маркери на митохондриите и апарата на Голджи в междуклетъчни мостове между герминативните клетки при формиране на примордиални фоликули в овариални срези от новородени мишки.

## 4. Материали и методи

### 4.1. Използван биологичен материал

За целите на нашите изследвания са използвани серийни срези от човешки поликистозни яйчници, както и серийни срези на яйчници от новородени мишки BALB/c (еднодневни и двудневни), включени в парафин. Човешките овариални срези са получени като съпътстващо изследване към стандартния хистопатологичен анализ на материал, биопсиран по време на лапароскопска фенестрация на яйчника при жени с PCOS. Използвани са серийни срези от 8 пациентки с PCOS според установено хистопатологично заключение от Лабораторията по обща и клинична патология на „Майчин дом“ - София. Получаването на допълнителни срези за целта на този анализ е одобрено от КЕНИМУС (Комисията по етика на научните изследвания в Медицински университет – София) и е предварително декларирано от пациентките чрез подписване на информирано съгласие за това. Фиксирането, включването на биопсирания материал, рязането на срезите и тяхното депарафиниране следват обичайната методика на Лабораторията по клинична патология на СБАЛАГ „Майчин дом”. Работата е финансирана по Договор 37 – 2012 към Медицински университет – София.

Работата с лабораторни мишки е част от следващ научен грант към Медицински университет – София: Договор 16 – 2015. Изолирането на яйчниците, фиксирането им, рязането и монтирането на срезите са извършени в Секция Имунобиология на размножаването, Институт по биология и имунология на размножаването (ИБИР) към Българската академия на науките (БАН). Яйчниците от новородени мишки, линия BALB/c, са изолирани, фиксирани в 10% неутрален формалин и включени в парафин през първия и втория ден след раждането. Парафиновите блокчета са нарязани на срези с дебелина 5µm и монтирани върху адхезивни микроскопски стъкла. Пригответени са общо 195 овариални среза от новородени мишки, 86 от които от еднодневни и 109 от двудневни мишки. Препаратите са подложени на последваща обработка и анализ, както е описано в следващите части на раздела.

В изследванията на зреещи миши овоцити също са използвани мишки от линията BALB/c, към които има специфични изсквания: женски предпубертетни, девствени мишки на възраст 22-25 дни. Те са подложени на хормонална стимулация по схема, за да бъдат изолирани миши яйцеклетки в различна степен на мейотична зрялост. Животните са осигурени от вивариума на Експериментална и развъдна база за опитни животни – гр. Сливница.

Работата с миши яйчници и изолирани миши овоцити, като проектно финансирана от Медицински университет – София, е одобрена от КЕНИМУС.

Работата по обработка на срезите и изолираните овоцити, тяхното флуоресцентно оцветяване, епифлуоресцентно наблюдение и анализът на получените резултати е проведена изцяло в Катедра Биология на Медицински факултет при Медицински университет – София. Лазерната сканираща конфокална микроскопия на избрани обекти е провеждана в Лабораторията за конфокална и светлинна микроскопия на ИБИР, БАН.

## **4.2. Реактиви за специфично белязване на клетъчни компоненти**

### **4.2.1. Първи антитела**

- Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin (миши IgG1 изотип), клон No. PCK-26, срещу цитокератини 1, 5, 6 и 8, (Sigma-Aldrich), в работно разреждане 1:300;
- Polyclonal Anti-Vimentin (заешко антитяло), в работно разреждане 1:1000 пъти;
- Monoclonal Anti-Vimentin (миши IgM изотип), клон Vim 13.2, (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:200;
- Polyclonal anti-PCM-1 (заешко антиляло), разпознава N-крайния домен на белтъка, (Santa Cruz Biotechnology, USA), в работно разреждане 1:300;
- Anti-Voltage dependent anion channel 1 / VDAC1 (мише IgG2a антитяло), срещу белтъка VDAC1, образуващ канали във външната митохондриална мембрана, (Quartett, Германия), в работно разреждане 1:100;

- Anti-Golgi peripheral membrane protein p65/GRASP65 (заешко IgG антитяло), разпознава Голджи цистерни в широк набор еукариоти (Quartett, Германия), в работно разреждане 1:40;
- Anti-DEAD box protein 4 / DDX4– заешко IgG антитяло, срещу РНК хеликаза, характерна за герминативни клетки в широк набор еукариоти, (Quartett, Германия), в работно разреждане 1:40;
- моноклонално анти- $\alpha$ -тубулиново антитяло (мише, от клас IgG1), клон DM1A, (Sigma – Aldrich, Германия), срещу  $\alpha$ -тубулин в широк набор еукариоти, в работна концентрация  $0,5 \div 1 \mu\text{g/ml}$ .

#### **4.2.2. Втори антитела**

- козе антитяло срещу заешки IgG, белязано с FITC, (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:80;
- козе антитяло срещу миши IgG, белязано с FITC (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:200;
- козе антитяло срещу миши IgG, белязано с TRITC (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:60;
- козе антитяло срещу заешки IgG, белязано с TRITC (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:500.

#### **4.2.3. Други реактиви за визуализация на клетъчни компоненти**

- фалоидин – TRITC (Sigma – Aldrich, Германия) с работна концентрация  $1 \mu\text{g/ml}$ ;
- НОЕСНСТ (33258) (Sigma – Aldrich, Германия) с работна концентрация  $1 \mu\text{g/ml}$ ;
- хематоксилин и еозин за стандартно хистологично оцветяване (Имунобиология на размножаването, ИБИР, БАН).

### 4.3. Допълнителни реактиви, разтвори и буфери

- суперблок – Super Block – блокира неспецифично фоново светене, (ScyTek, USA);
- FITC-Protein Blocking – блокира неспецифично свързване на FITC-конюгирани антитела в тъканни проби, (Quartett, Germany);
- нормален кози серум – блокира неспецифично свързване на антителата (Sigma – Aldrich, Германия);
- ксилол;
- низходяща алкохолна редица – 100%, 96%, 90%, 80% и 70% етанол, разтворен в dH<sub>2</sub>O;
- възходяща алкохолна редица – 70%, 80% и 96% етанол, разтворен в dH<sub>2</sub>O;
- цитратен буфер – Bio SB 20x immuno/DNA retriever with citrate (Bio SB, USA) и dH<sub>2</sub>O в съотношение съответно 1:10;
- dH<sub>2</sub>O за промиване;
- миеш буфер – PBS (pH 7,2) (Sigma – Aldrich, Германия);
- инкубиращ буфер (за антителата, използвани за овариалните срези) - PBS (pH 7,2) + 0,3% BSA + 0,02% Na азид (Sigma – Aldrich, Германия);
- влажна камера – в петри с капак се поставя навлажнена филтърна хартия;
- 100% Polyvinyl alcohol (Fluka, Германия);
- серия от разреждания на поливинил алкохол – 5%, 10%, 30% и 50%;
- Merional (IBSA, Италия) – човешки менопаузен гонадотропин, пречистен от урината на жени в менопауза. Има 1:1 фоликулостимулираща и лутеинизираща активност.
- Pregnyl (Organon, Холандия) – човешки хорионен гонадотропин, пречистен от урината на бременни жени. Има лутеинизиращо действие.

Предназначението му беше да предизвика завършване на овоцитното зреене и овулация.

- хранителна среда Leibovitz (Sigma – Aldrich, Германия) за дисекция на яйчници. Към нея се добавят:
  - 3mg/ml BSA (Sigma – Aldrich, Германия);
  - 2,5µg/ml инсулин (Sigma – Aldrich, Германия);
  - 5µg/ml трансферин (Sigma – Aldrich, Германия).
- хиалуронидаза (Sigma – Aldrich, Германия) - За отстраняването на кумулуса, в работна концентрация 0,5 mg/ml;
- Миещ буфер I – PBS (pH 7,2) + 0,3 % BSA (Sigma – Aldrich, Германия);
- Миещ буфер II – PBS (pH 7,2) + 0,3 % BSA + 0,02% Na азид (Sigma – Aldrich, Германия);
- Миещ буфер III – PBS (pH 7,2) + 0,3 % BSA + 1 µl/ml Tween 20 (Sigma – Aldrich, Германия);
- Фиксатор – 4% PFA (Sigma – Aldrich, Германия) + 0,04% Тритон X-100, разтворени в PBS.

#### **4.4. Използвани специфични апарати, консумативи и лабораторни съдове**

- Водна баня (GDR, Германия);
- CO<sub>2</sub> инкубатор Hera cell 150 (Heraeus, Германия);
- ламинарен бокс (Flow laboratories, САЩ);
- топла масичка (Labotect, Германия);
- стереомикроскоп (Zeiss, Германия);
- ембриологични петрита (Corning, САЩ);
- 96 ямкови стерилни плаки със заоблено дъно (Corning, САЩ);
- 0,22µm бактериални филтри (Corning, САЩ);
- източени на пламък стъклени пастъорки, приготвени в момента в лабораторията;
- Микроскоп Zeiss Axioskop 20 с приставка за флуоресцентна микроскопия и фотокамера (Zeiss, Германия);

- Лазерен сканиращ конфокален микроскоп LeicaTSC SPE с модул за LCM5 Pascal.

#### **4.5. Използвани лабораторни методи:**

##### **4.5.1. Депарафиниране и хидратиране на овариалните срези**

- Стъклата се поставят в три последователни кювети с ксилол, като във всяка престояват по 10 мин (след тази стъпка срезите не бива да се оставят да изсъхнат);
- Следва третиране с етанол в низходяща алкохолна редица - по 5 мин във всеки разтвор;
- Срезите се оставят за 5 мин в dH<sub>2</sub>O;
- Варене на срезите в цитратен буфер (за разкриване на антигените) за 20 мин на 90 C°;
- Следва охлаждане на срезите на стайна температура до избистряне на разтвора;
- Стъклата се промиват трикратно за по 5 мин в PBS буфер.

##### **4.5.2. Блокиране на неспецифична флуоресценция**

Приготвя се влажна камера, в която препаратите да бъдат поддържани влажни по време на обработката. Тя представлява петри с капак, в което е поставена навлажнена филтърна хартия.

- Човешките овариални срези се накапват с нормален кози серум за блокиране на неспецифичното флуоресцентно светене за 20-30 мин във влажната камера;
- Мишите срези се инкубират с FITC блок във влажната камера за 15 мин;
- Стъклата се промиват трикратно за по 5 мин в PBS буфер;
- Допълнително, отново във влажна камера, мишите срези се третират със суперблок за 15 мин и се промиват трикратно за по 5 мин в PBS буфер.

#### **4.5.3. Флуоресцентно белязване за специфични клетъчни компоненти в яйчниковите срези**

- Препаратите се третират с първи антитела за белязване на специфичните клетъчни компоненти. Работи се отново във влажна камера, инкубацията трае 60 мин;
- Четирикратно промиване на стъклата за по 5 мин в PBS буфер;
- Инкубиране на препаратите в разтвор, съдържащ конюгирани с флуорохром втори антитела (60 мин, влажна камера);
- Трикратно промиване за по 5 мин в PBS буфер;
- Контраоцветяване с Hoechst 33258 за 5 мин;
- Трикратно промиване за по 5 мин в PBS буфер;
- Покриване на срезите с 100% Polyvinyl alcohol. За стъкла с размери 22x32mm се накапват 15 µl и се поставя покривно стъкло;
- Препаратите се съхраняват на тъмно при 4°C до момента на наблюдението;
- Микроскопирането се извършва най-рано на следващия ден.

В различните опитни постановки са прилагани следните комбинации от реактиви за специфично откриване на клетъчни компоненти:

- Анти-цитокератиново и анти-виментиново антитяло + Hoechst 33258;
- Анти-PCM-1 и анти-VDAC-1 антитяло + Hoechst 33258;
- Анти-GRASP65 антитяло и фалоидин-TRITC + Hoechst 33258;
- Анти-PCM-1 и анти-цитокератиново антитяло + Hoechst 33258;
- Анти-PCM-1 и анти-виментиново антитяло + Hoechst 33258;
- Анти DDX4 антитяло и фалоидин-TRITC + Hoechst 33258.

В случаите с едновременно белязване на два компонента чрез антитела едното второ антитяло е FITC, а другото – TRITC конюгат. При визуализиране на микрофиламенти второто антитяло срещу другия изследван компонент е FITC конюгат и в разтвора му се прилага фалоидин TRITC.

#### **4.5.4. Оцветяване с хематоксилин – еозин**

- Препаратите се депарафинират и хидратират, както е посочено в т. 4.5.1., но срезите не се варят в цитратен буфер;
- Следва оцветяване с хематоксилин за 1-2 мин във влажна камера;
- Диференциране на течаща вода за около 60 мин.;
- Оцветяване с еозин за 4 мин във влажна камера;
- Обезводняване във възходяща алкохолна редица: 70%, 80% и 96% разтвор за няколко секунди и в 100% разтвор за 2-5 мин.;
- Изчистване на алкохола в две последователни кювети с ксилол. Срезите престояват във всяка по 10 мин;
- Включване в смола и поставяне на покривни стъкла.

#### **4.5.5. Получаване на зреещи овоцити**

Ден първи: Яйчникова стимулация на мишките:

Мишките се инжектират интерперитонеално между 16 – 17 часа следобед с фоликулостимулиращ хормон. На всяка мишка се инжектират по 7,5 IU разтворени в 100µl физиологичен разтвор. Използваният хормонален препарат е Merional – човешки уринарен препарат, който има 1:1 фоликулостимулираща и лутеинизираща активност (IBSA, Италия).

Ден втори :

- Приготвяне на хранителната среда;
- Стерилно филтруване на средата през 22µm бактериален филтър;
- Оставяне на средата за една нощ в CO<sub>2</sub> инкубатор.

Ден трети: Получаване на овоцити след хормонална стимулация:

- 40 часа след инжектирането с Merional , мишките се убиват с цервикална транслокация след упояване с етер. Отваря се кожата откъм гърба, където яйчниците прозират през перитонеума. Яйчниците се отпрепарират и се поставят в петри с физиологичен разтвор. С помощта на пинсети се прехвърлят в ембрионално петри със среда Leibovitz. Фоликулите се

пунктират с помощта на инсулинова спринцовка с игла. Избират се големи антрални фоликули, като се работи със стереомикроскоп и топла масичка. Получават се яйцеклетки, които могат да са голи или в комплекс с кумулусни клетки. Всички се преместват с източена на пламък пастъорка в ново петри с Leibovitz.

- Отстраняване на кумулусните клетки с хиалуронидаза, разтворена в Leibovitz, яйцеклетките се оставят в тази среда в инкубатора за около 5 – 10 минути, след което кумулусът се отстранява механично чрез пипетиране под стереомикроскоп.
- Фиксиране на овоцитите. Овоцитите се преместват в 96 ямкова плака, като се измиват последователно в 3 ямки с по 100  $\mu$ l миеш буфер I. Всяко плакнене е за 5-10 мин на 37°C. Следва преместването на яйцеклетките във фиксатора, като се инкубират за 45-60 минути на 37°C. След изтичане на времето овоцитите се измиват в две последователни ямки със 100  $\mu$ l миеш буфер I (отново миенето е за 5-10 мин на 37°C) и се преместват в нова ямка с 100  $\mu$ l миеш буфер II. Така фиксираните клетки могат да се съхраняват за една седмица в хладилник на 4°C, като плаката се запечатва с парафилм.

#### Визуализация на центриолни сателити, тубулин и хроматин.

Центриолните сателити и тубулинът се отчитат след непряка имуноцитохимична реакция. Хроматинът се оцветява с флуоресцентно багрило Hoechst 33258, което се свързва специфично с ДНК. Работи се в 96 ямковата плака.

- след като клетките са фиксирани, следва инкубиране на яйцеклетките с първи антитела срещу РСМ-1 и тубулин, разтворени в буфер I (на 37°C за 45 минути);
- миене 2 пъти по 10 минути в миеш буфер III;
- прехвърляне в трета капка със същия буфер за 20-30 минути;

- инкубиране на овоцитите за 45 мин в разтвор на миеш буфер I, съдържащ вторите антитела, белязани с различни флуорохроми (анти-миши FITC-конюгат и анти-заешки TRITC конюгат) и Hoechst 33258;
- От този момент плаките се пазят на тъмно;
- Трикратно промиване за по 10 минути в миеш буфер III;
- прехвърляне в четвърта капка със същия буфер за 20-30 минути на 37°C;
- включване в поливинил алкохол с нарастваща концентрация – 5%, 10%, 30% и 50%, разтворен в миеш буфер II; яйцеклетките се поставят за по 10 минути в 5%, 10% и 30% поливинил алкохол. 50%-ният поливинил алкохол се слага в ембриологично петри, където клетките се оставят за 15 минути;
- прехвърляне на яйцеклетките на предметни стъкла: за покривни стъкла с размери 22x32mm се капят 15 µl 100% поливинил алкохол; в тази капка веднага се преместват овоцитите и се поставя покривно стъкло;
- Препаратите се съхраняват на тъмно при 4°C до момента на наблюдението. Микроскопирането се извършва най-рано на следващия ден.

#### **4.5.6. Наблюдение и документиране на резултатите**

Всички препарати първоначално се анализират чрез епифлуоресценция. Използван е епифлуоресцентен микроскоп Axioskop 20 с приставка за флуоресцентна микроскопия и фотокамера (Zeiss) при възбуждащ филтър 560 nm за TRITC, 490 nm за FITC и 365 nm за Hoechst.

Избрани препарати и подходящи участъци от тях са подложени на лазерна сканираща конфокална микроскопия, провеждана в Института по биология и имунология на размножаването на БАН. Получаните резултати позволяват прецизен анализ на проследяваните структури както при човешките овариални срези, така и при мишите срези и единични яйцеклетки. Стандартната дебелина на оптичните срези е 0,2 микрометра. Използван е микроскоп LeicaTSC SPE с модул за LCM5 Pascal.

## **5. Резултати**

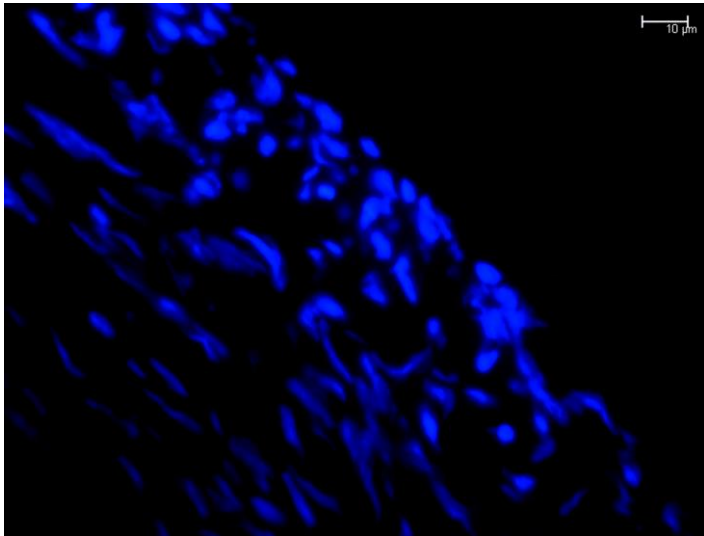
### **5.1. Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули**

Изследването обхваща серийни срези от 8 пациентки с PCOS според установено хистопатологично заключение от Лабораторията по обща и клинична патология на „Майчин дом“ - София. При две от пациентките са получени данни за локализация на интермедиерните филаменти само в овариалната тъкан поради липса или оскъден брой фоликули в срезите. Един от случаите показва неподходящо качество на срезите, което не позволи анализ на този материал. Анализът обхваща серийни овариални срези от останалите пет пациентки с PCOS, при които яйчниковата тъкан показва изобилие от примордиални фоликули.

Срезите са наблюдавани и документирани чрез епифлуоресценция, след което най-интересните находки са прецизно анализирани чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия.

Получените резултати в цялостната яйчникова тъкан показват присъствие на цитокератини и виментин в периферния слой на яйчника, както и в соматичните клетки, обкръжаващи овоцита в примордиалните фоликули. Данни за локализацията на интермедиерните филаменти в овариален кортекс са представени на Фигура 1.

Данни за присъствие на белтъци на интермедиерните филаменти във фоликулните клетки на човешки примордиални фоликули са получени чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия. Представени са на Фигура 2.

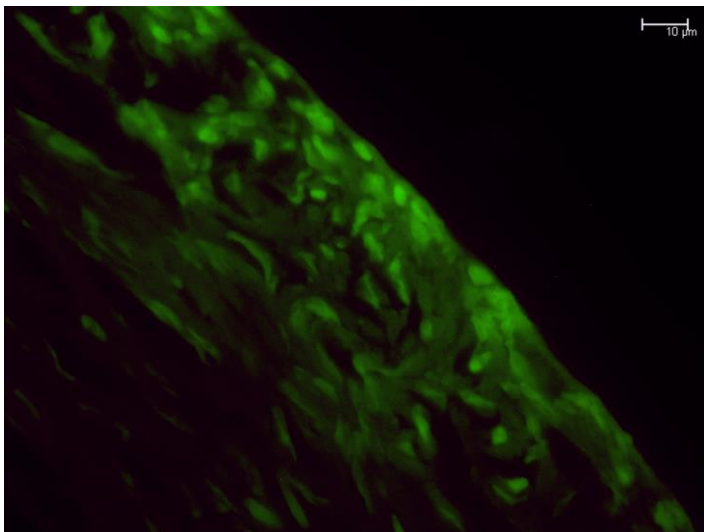


Фигура 1.

Епифлуоресцентна микроскопия на човешки яйчник – реакция за интермедиерни филаменти в кортекса.

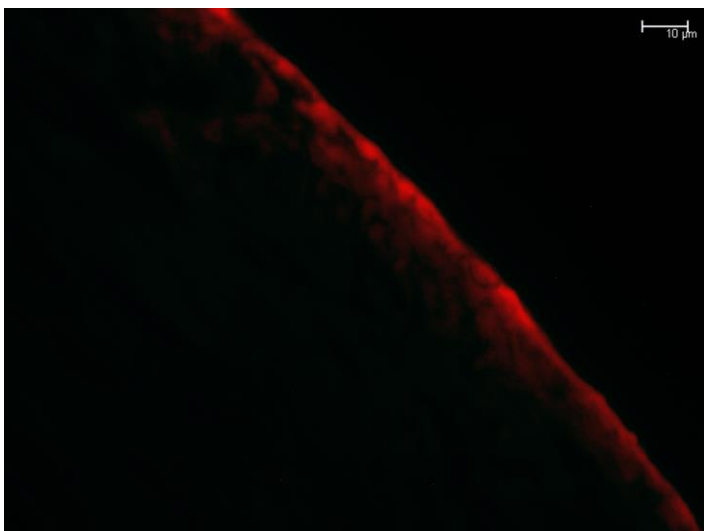
1А – флуоресцентно оцветяване за хроматин

1А (Hoechst 33258).



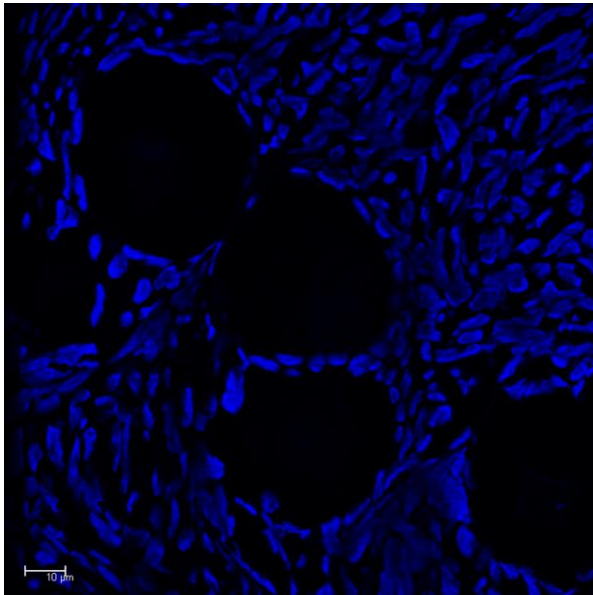
1Б – цитокератини, визуализирани в зелено чрез FITC.

1Б



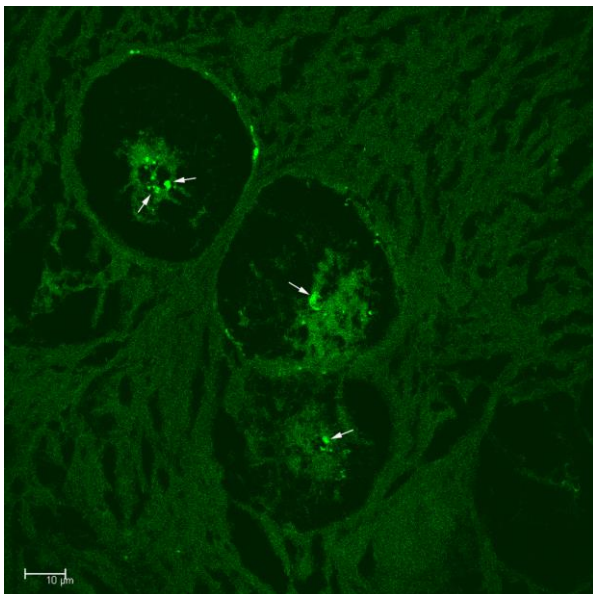
1В – имунофлуоресцентна реакция за виментин в tunica albuginea, визуализиран чрез TRITC в червено.

1В



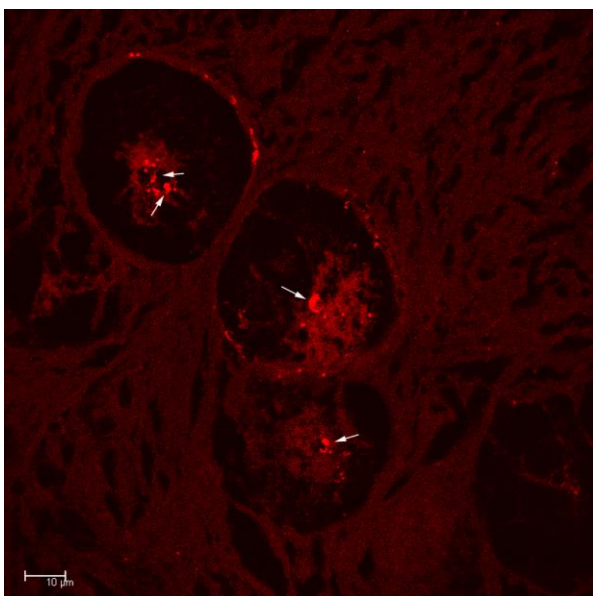
Фигура 2. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на група човешки примордиални фоликули. Вижда се реакция за интермедиерни филаменти във фоликулните клетки. Във вътрешността на фоликулите, извън фокуса на овоцитното ядро, се наблюдават части от перинуклеарни агрегати, посочени със стрелки.

2А – флуоресцентно оцветяване за хроматин (Hoechst 33258).



2Б – цитокератини, визуализирани в зелено чрез FITC.

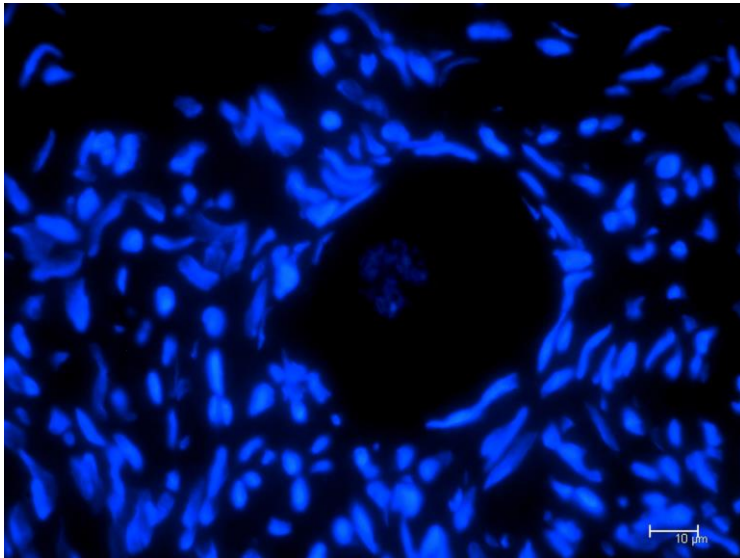
2Б



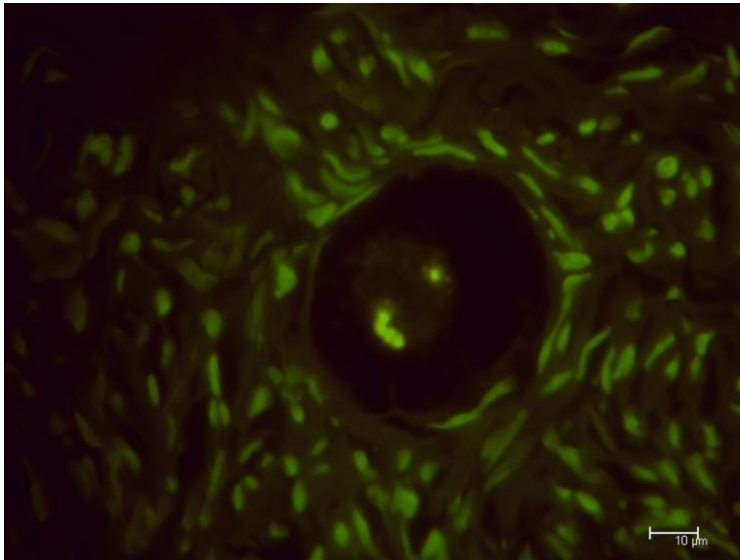
2В - имунофлуоресцентна реакция за виментин, визуализиран чрез TRITC в червено.

2В

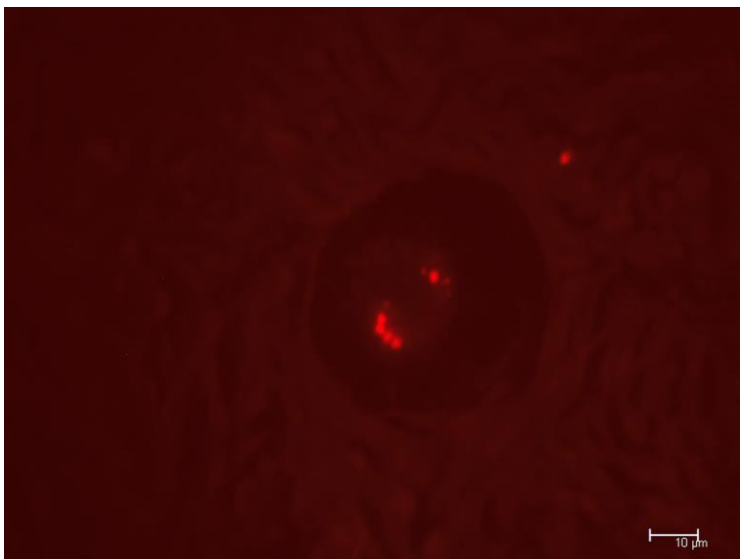
Получени са оригинални данни за присъствието на белтъците на интермедиерните филаменти в примордиалните фоликули и в самите овоцити. При серийните срези е наблюдавана имунофлуоресцентна реакция за колокализация на цитокератини и виментин със специфичен вид в перинуклеарния район на овоцита. Установено е присъствие на грануларна структура в съседство с ядрото на овоцита. Тя е образувана от близки по размер гранули, подредени във форма на полукръг или кръг. Резултати от епифлуоресцентна детекция на перинуклеарни агрегати, в които се наблюдава колокализация на цитокератини и виментин, са показани на Фигури 3, 4 и 5, а резултат от детекция чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия – на Фигура 6. Структурата на перинуклеарния агрегат съответства на асиметрично струпване от органели, познато като телце на Балбиани.



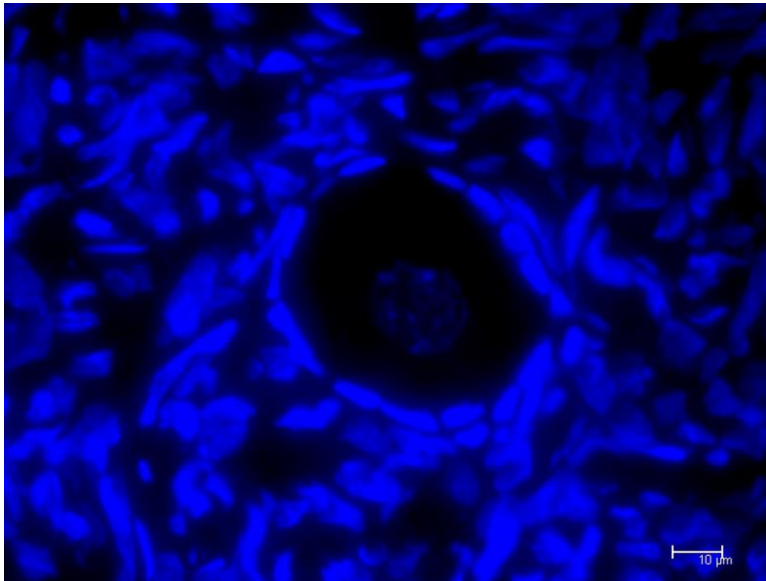
Фигура 3.  
 Епифлуоресценция на  
 човешки примордиален  
 фоликул – в овоцита се  
 наблюдава грануларна  
 структура с  
 полукръгова форма и  
 перинуклеарна позиция.  
 3А 3А – визуализация на  
 хроматин чрез Hoechst  
 33258.



3Б – реакция за  
 цитокератини (FITC).  
 3Б



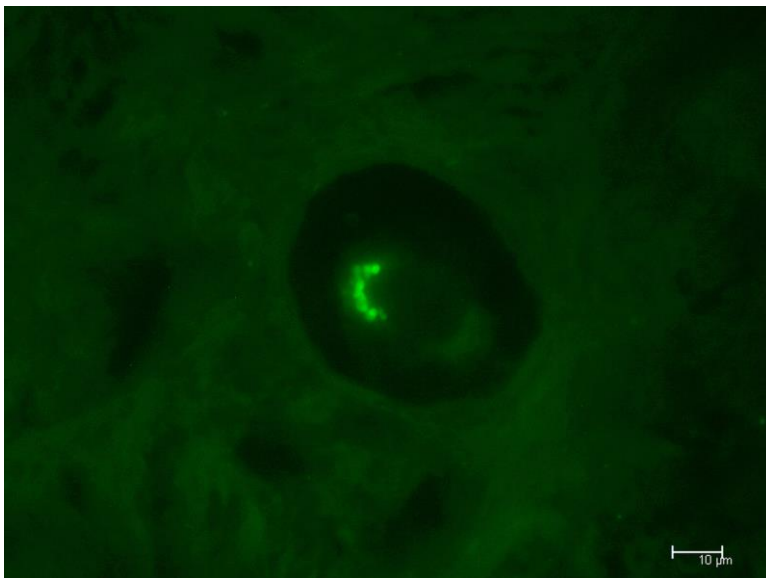
3В – визуализация на  
 виментин чрез TRITC.  
 3В



Фигура 4.  
Епифлуоресцентен образ на перинуклеарен агрегат с полулунна форма, образуван от гранули.

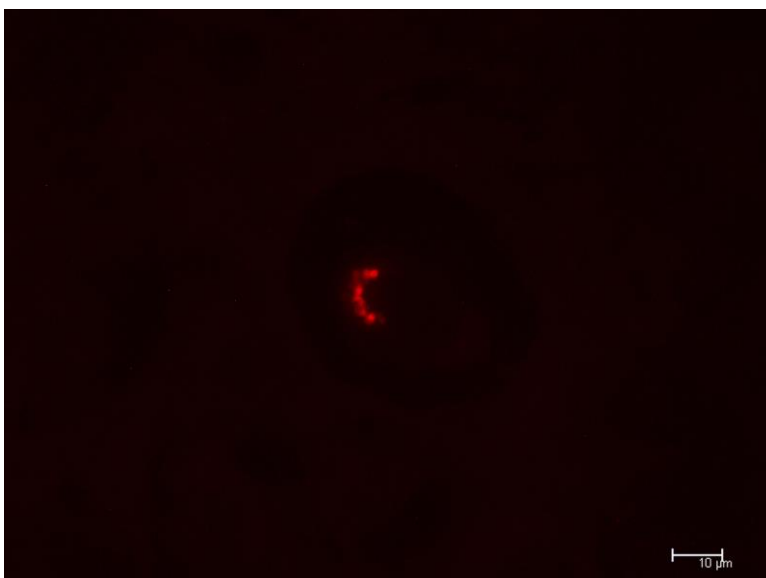
4А – оцветяване за хроматин с Hoechst

4А 33258.



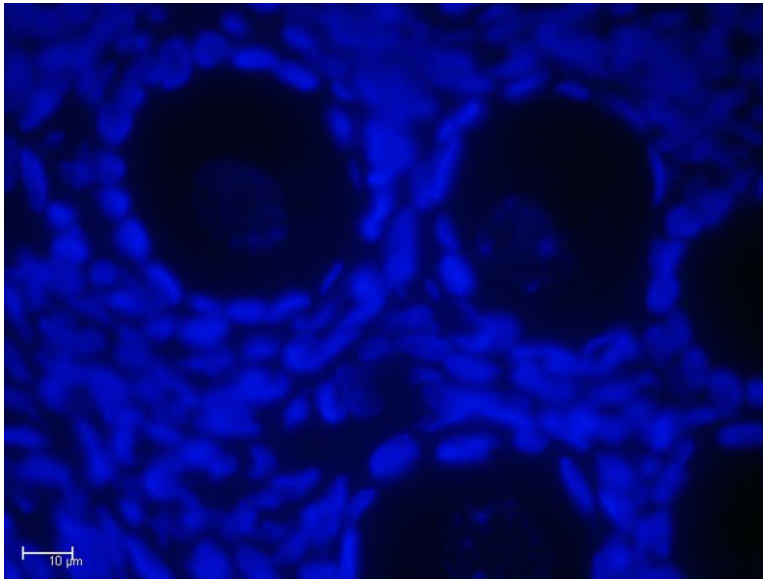
4Б – визуализация на полулунно струпване от цитокератини в перинуклеарния район на овоцита (чрез

4Б FITC). чрез FITC.



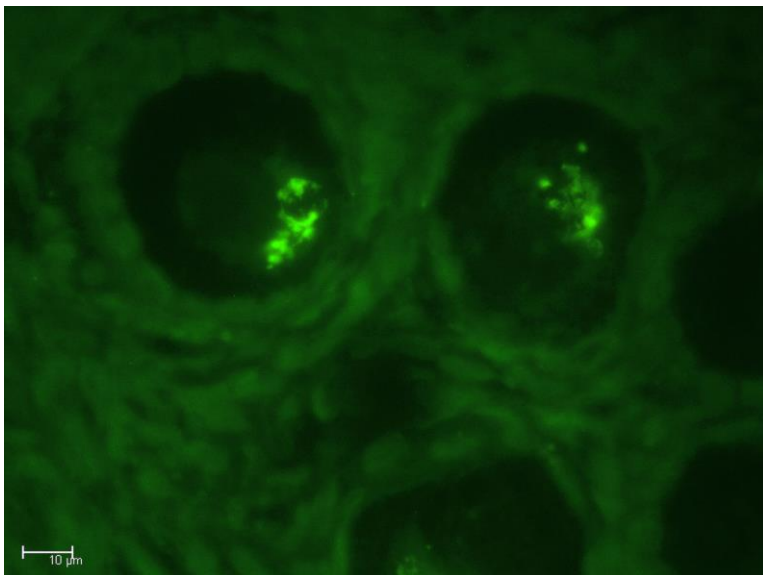
4В – агрегатът е позитивен и за виментин (TRITC).

4В



Фигура 5. Група човешки примордиални фоликули с характерна форма на перинуклеарен агрегат, позитивен за белтъци на интермедиерни филаменти.

5А

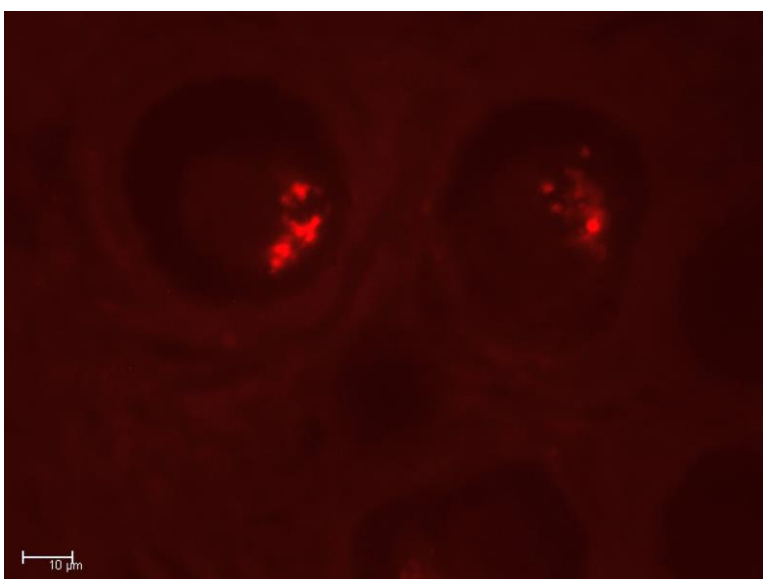


5А – визуализация на хроматина чрез Hoechst 33258.

5А

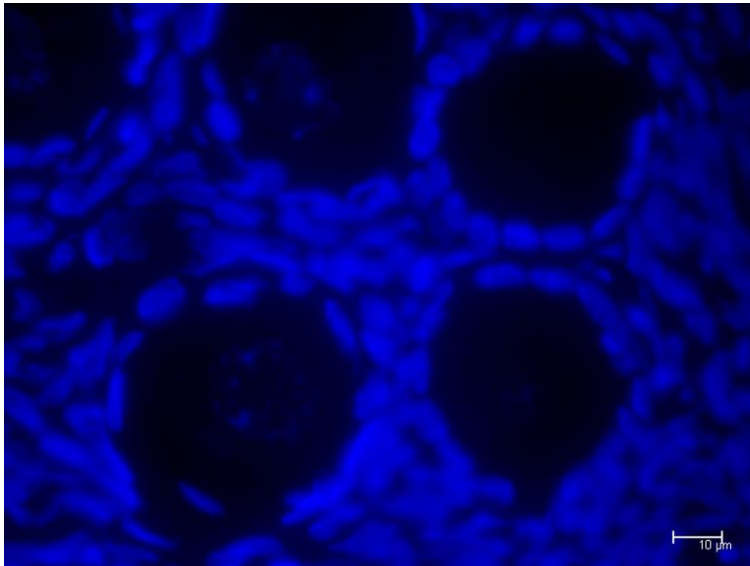
5Б – реакция за цитокератини в овоцитите под формата на полумесец, белязани с FITC.

5Б



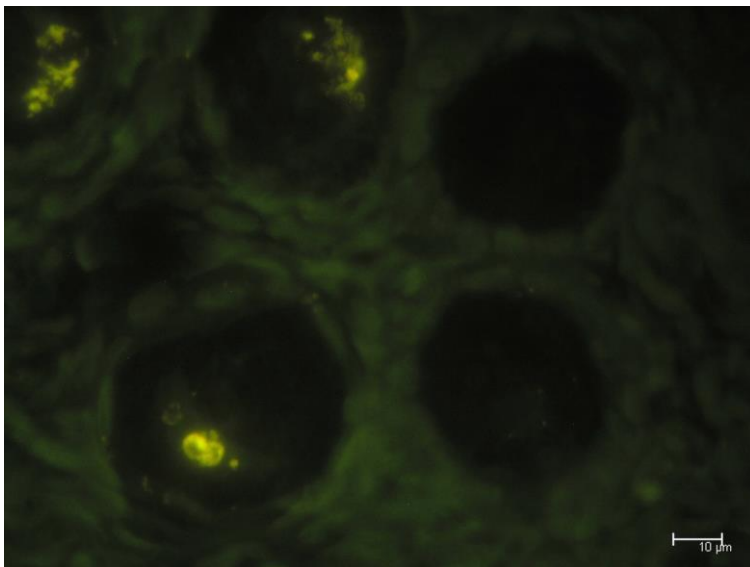
5В – същите агрегати, позитивни за виментин.

5В



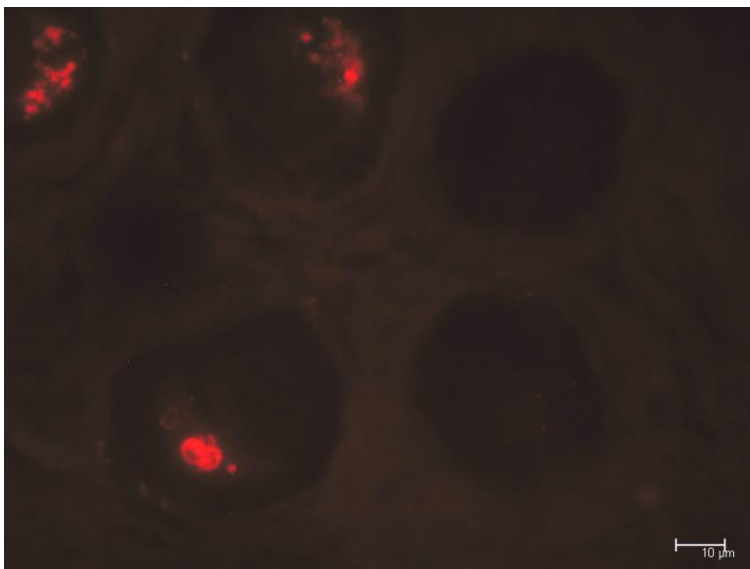
5Г – визуализация на хроматина чрез Hoechst 33258.

5Г



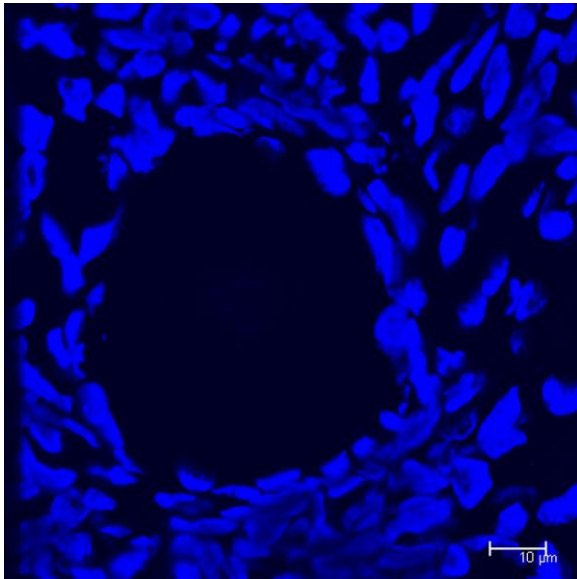
5Д – реакция за цитокератини в овоцитите под формата на двоен овал (долу вляво), белязани с FITC.

5Д



5Е – същите агрегати, позитивни за виментин. Фоликулите на двата комплекта фигури видимо принадлежат на една и съща група: Г, Д и Е допълват й, Б и В.

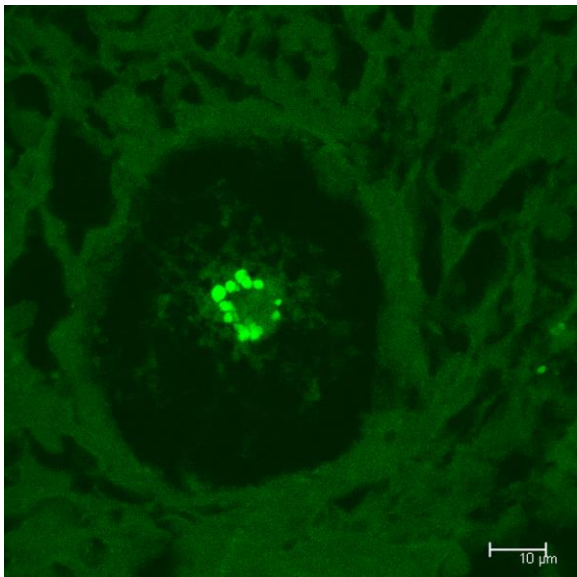
5Е



Фигура 6. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на човешки примордиален фоликул с кръгово подредени гранули на структура, съответстваща на телце на Балбиани.

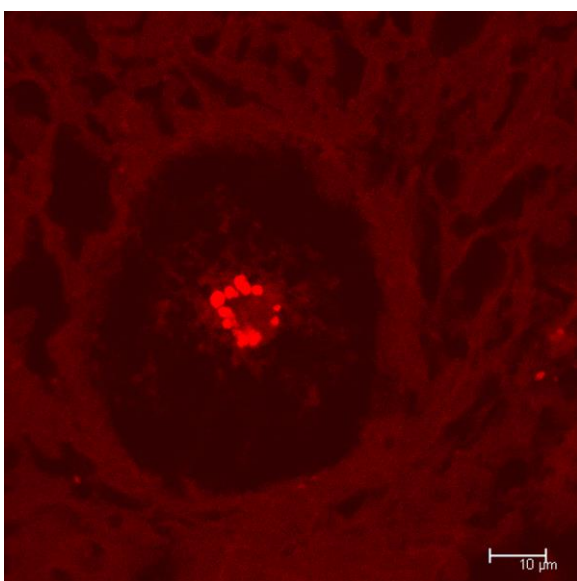
6А – хроматин (Hoechst 33258).

6А Ядрото на овоцита е извън оптичния срез.



6Б – реакция за цитокератини в кръговата структура (FITC).

6Б



6В – визуализация на виментин чрез TRITC в същия агрегат.

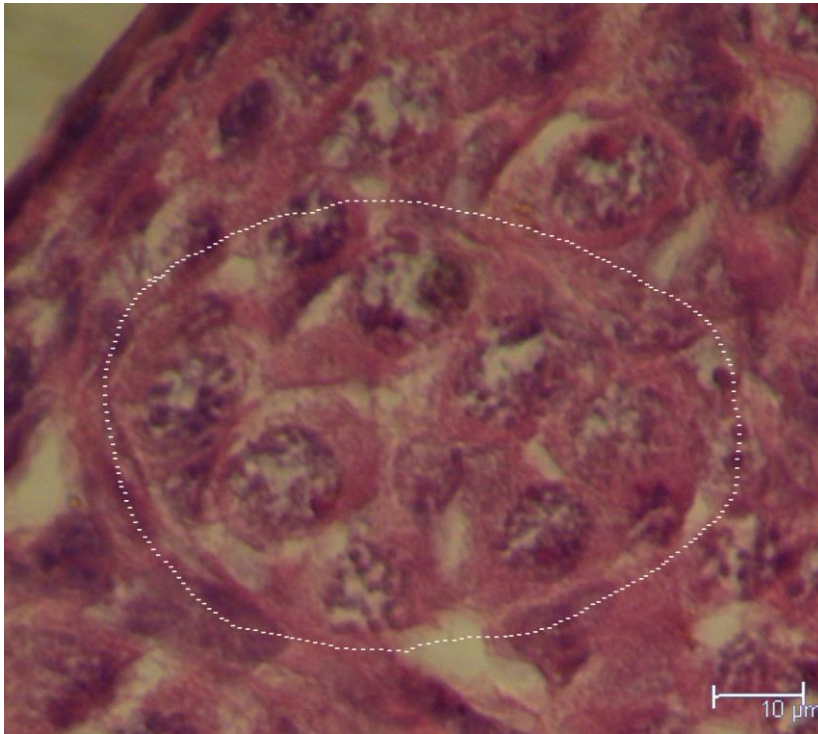
6В

## **5.2. Особености на овогенезата и фоликулогенезата в неонатален мишия яйчник – характерни морфологични разлики в срези от едnodневни и двудневни мишки**

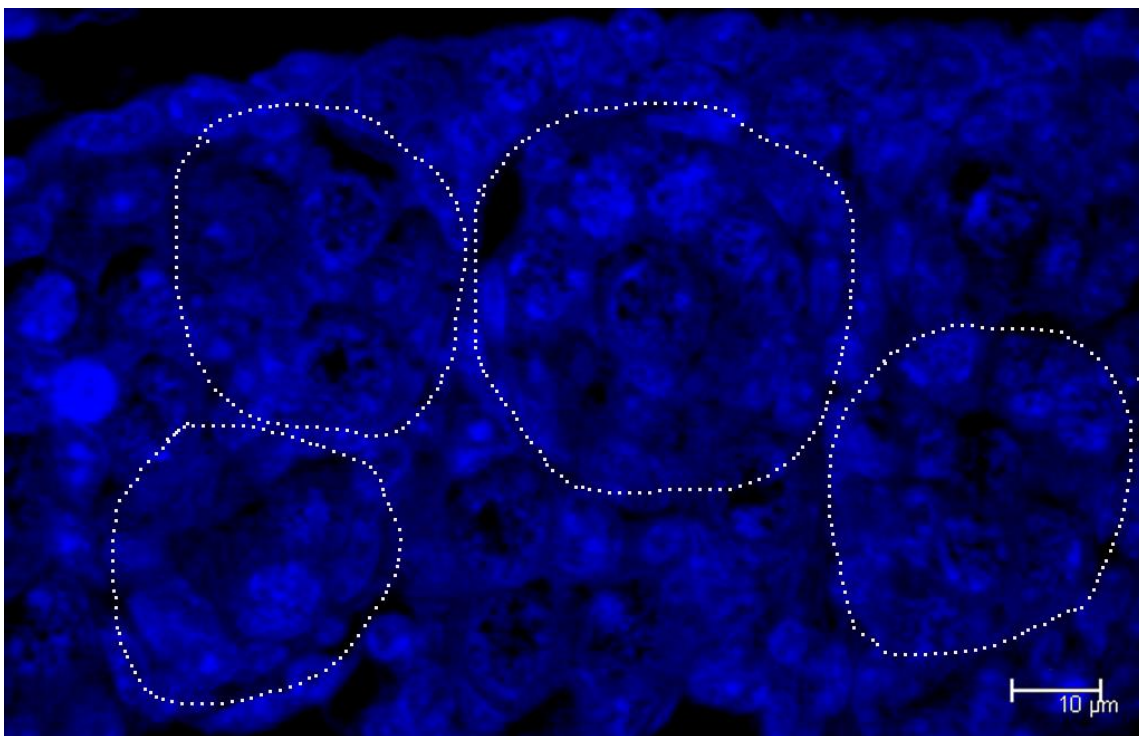
Яйчниците на новородените мишки предоставят възможност за изучаване на началните фази от образуването на примордиални фоликули поради характерни особености на развитието на герминативните клетки в мишия яйчник. Анализирани са общо 195 овариални среза от новородени мишки, 86 от които от едnodневни и 109 от двудневни мишки. Макар разликата във възрастта на мишлетата да не е значителна, в яйчниците се наблюдават значими разлики в организацията на герминативните и соматичните клетки при формирането на примордиални фоликули.

Стандартните хистологични срези са оцветени по класически метод с хематоксилин-еозин за добиване на представа за цялостната структура. Успоредно са наблюдавани срези, оцветени с флуорохрома Hoechst 33258, за оценка на състоянието на хроматина.

В срезите от едnodневни мишлета все още се наблюдават овоцити в началото на профаза I на мейозата, преди настъпването на периода на покой, наречен dictyate. Техният хроматин има нехомогенна структура, с ясно обособени струпвания кондензиран хроматин, видими в овоцитното ядро и очертаващи периферията му. Видът на хроматина кореспондира с периодите на мейотичната профаза I до пахитен включително. В някои овоцитни ядра се наблюдава единично хроматиново струпване, разположено близо до ядрената периферия. Процесът на образуване на примордиални фоликули е сравнително ранен: соматичните клетки са относително едри, с вретеновидна форма и ограждат овоцитите частично. В периферията на яйчника на едnodневните мишки се наблюдават обособени групи овоцити (зародишни гнезда). Фигура 7 представя срез от едnodневна мишка със зародишни гнезда.



7А Фигура 7.  
Зародишни гнезда  
(маркирани с  
пунктир) в  
периферията на  
срез от едnodневна  
мишка.  
7А – оцветяване с  
хематоксилин-  
еозин. Оригинално  
увеличение 1000х.

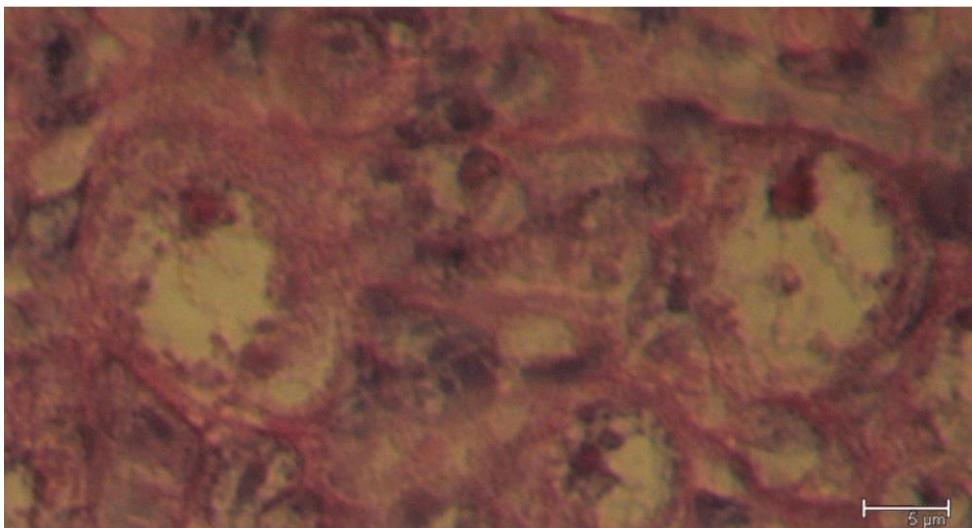


7Б

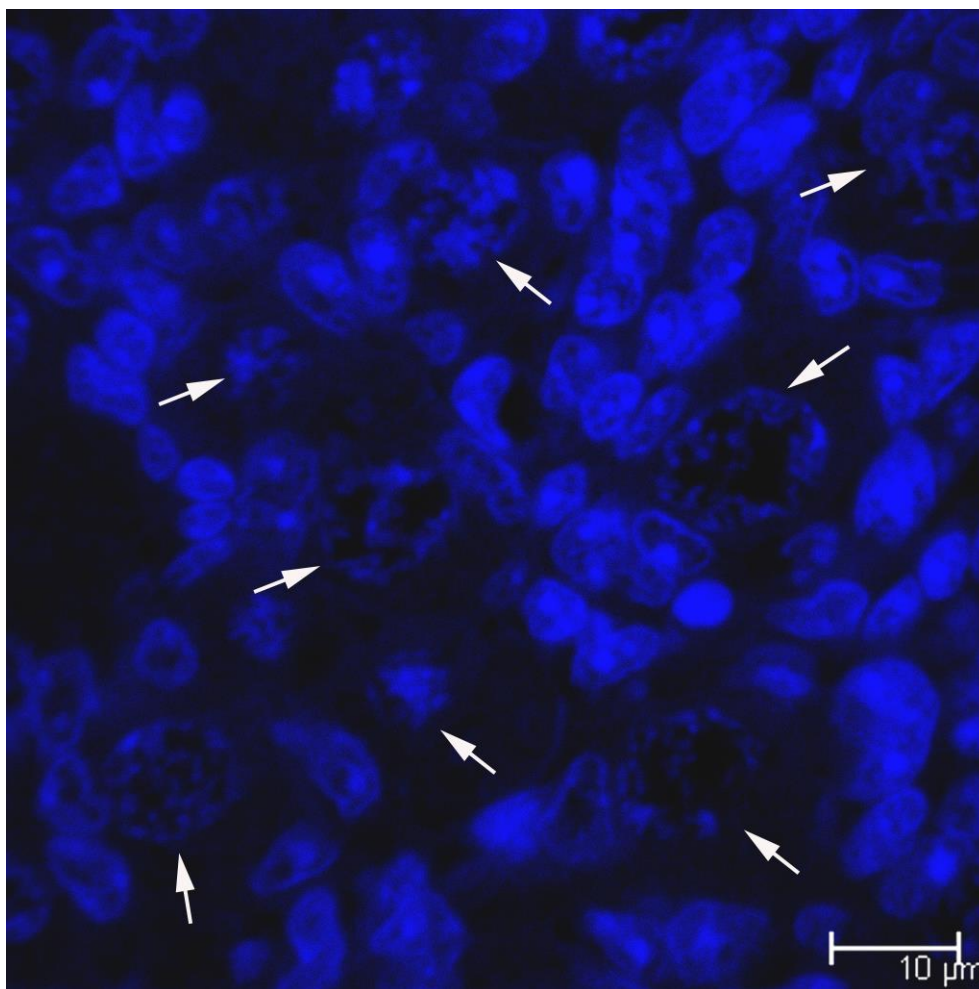
7Б - хроматинът на герминативните и соматичните клетки е визуализиран чрез Hoechst 33258. Лазерна сканираща конфокална микроскопия, оригинално увеличение 400х.

В тези зародишни гнезда овоцитите имат сходен вид на хроматина, съответстващ на профазни хромозоми, които са видимо в синхронна мейотична фаза – периодите преди dictyate на профаза I.

Синхронно развитие показват и овоцитите от медуларната зона на яйчника на едnodневни мишки, но там не се наблюдава повече обединение в зародишни гнезда. Характерният вид на овоцитните и соматичните ядра от медуларната зона е показан на Фигура 8. Нехомогенната структура на овоцитните ядра се дължи на хромозомна кондензация. Соматичните клетки все още не обгръщат изцяло овоцитите.

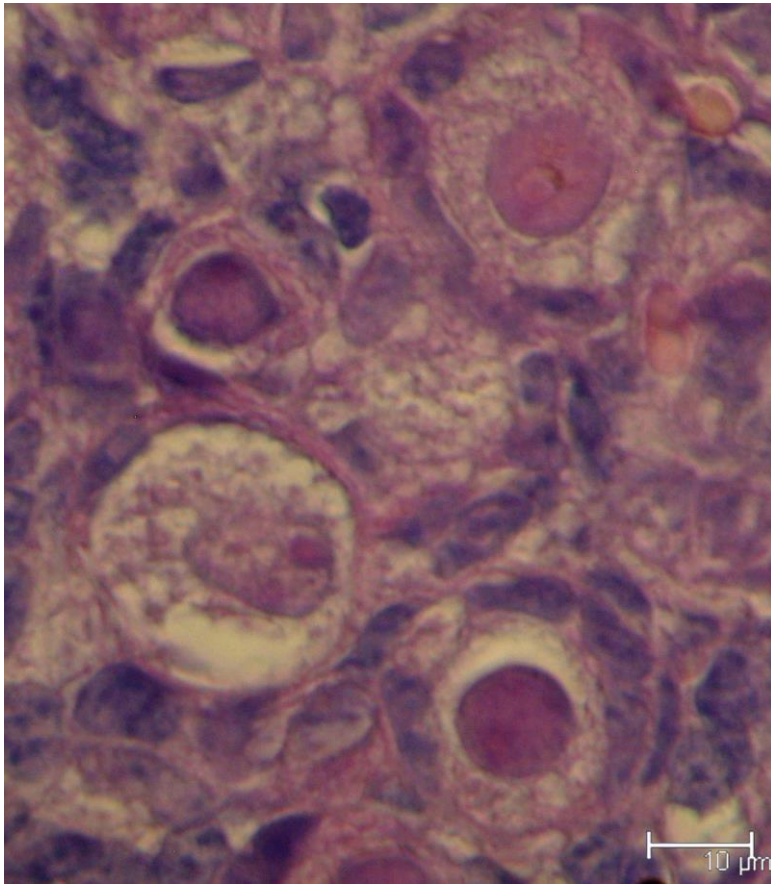


Фигура 8А.  
Изглед на срез  
от едnodневен  
миши яйчник  
след  
оцветяване с  
хематоксилин  
-еозин за  
светлинна  
микроскопия.



Фигура 8Б. Изглед на срез от едnodневен миши яйчник визуализиран чрез Hoechst 33258 и лазерна сканираща конфокална микроскопия. Стрелките обозначават овоцитните ядра в профаза I, оригинално увеличение 1000x.

В яйчниците на двудневните мишлета процесът на образуване на примордиални фоликули е напреднал и овоцитите са почти напълно оградени с по-плоски и удължени клетки. Хроматинът на овоцитите придобива по-хомогенен вид, съответстващ на настъпването на dictyate. Видимите очертания на хромозоми и техни струпвания се губят. Обичаен вид на яйчниковата тъкан в срези от двудневни мишлета е показан на Фигура 9.

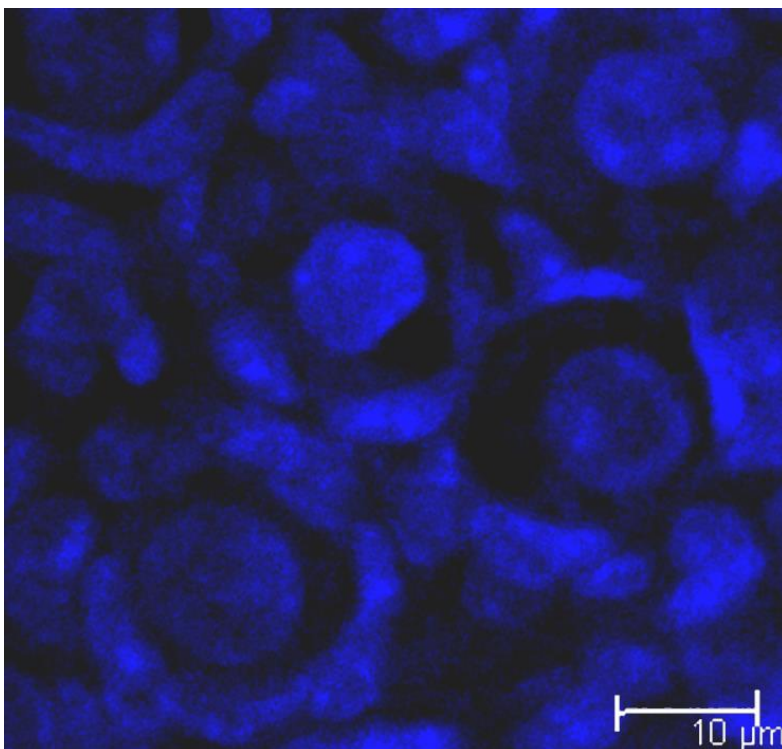


Фигура 9. Изглед на срез от двудневен миши яйчник. Овоцитните ядра имат хомогенна структура, съответстваща на мейотичния арест в dictyate. Удължени соматични клетки обгръщат овоцитите в примордиални фоликули.

Оригинално

9А увеличение 1000х.

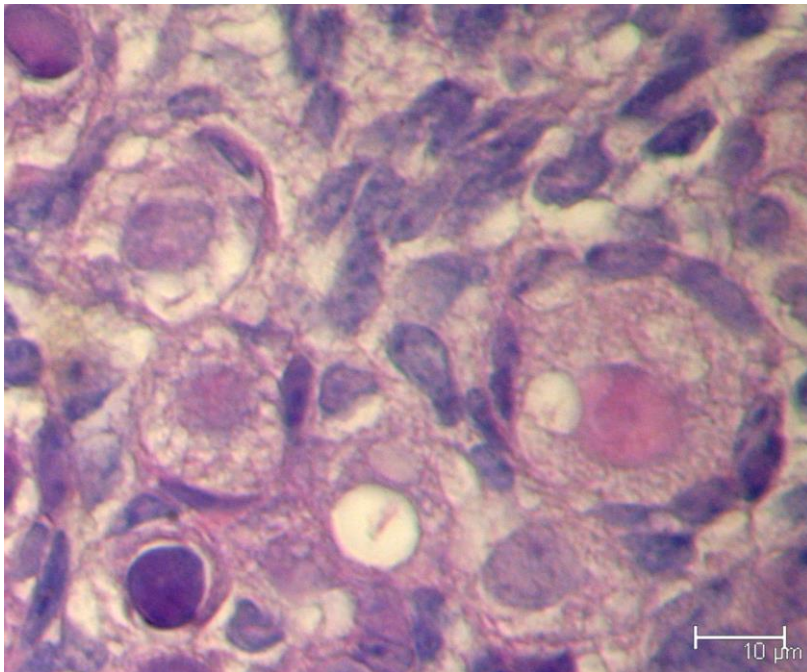
9А - оцветяване с хематоксилин-еозин за светлинна микроскопия



9Б - визуализация чрез Hoechst 33258 и лазерна сканираща конфокална микроскопия (Б).

9Б

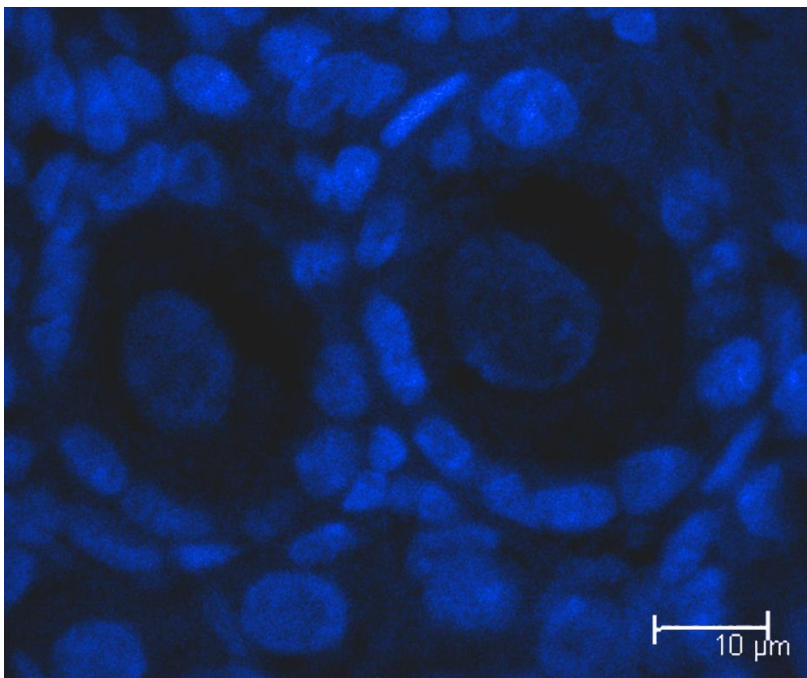
В някои яйчници се наблюдават и по-едри, добре оформени примордиални фоликули, както показва Фигура 10. Те се откриват най-вече в медуларната зона на яйчника.



Фигура 10.  
Оформени примордиални фоликули от медуларната зона на яйчник от двудневна мишка. Оригинално увеличение 1000х. Овоцитните ядра са с хомогенна хроматинова структура, а соматичните клетки са с плосък, понякога почти кубичен вид и ограничават изцяло примордиалните фоликули.

10А

10А - оцветяване с хематоксилин-еозин.



10Б

10Б – лазерна сканираща конфокална микроскопия, Noechst 33258.

### **5.3. Локализация и асиметрично разпределение на фибриларен актин и комплекс на Голджи в овоцити от новородени мишки**

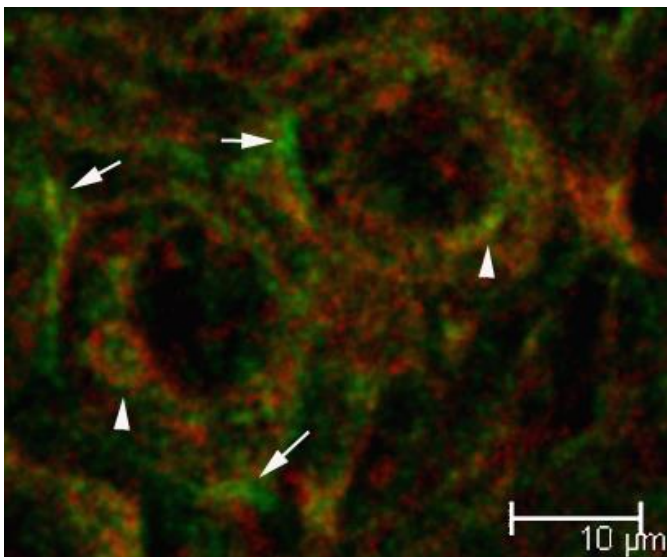
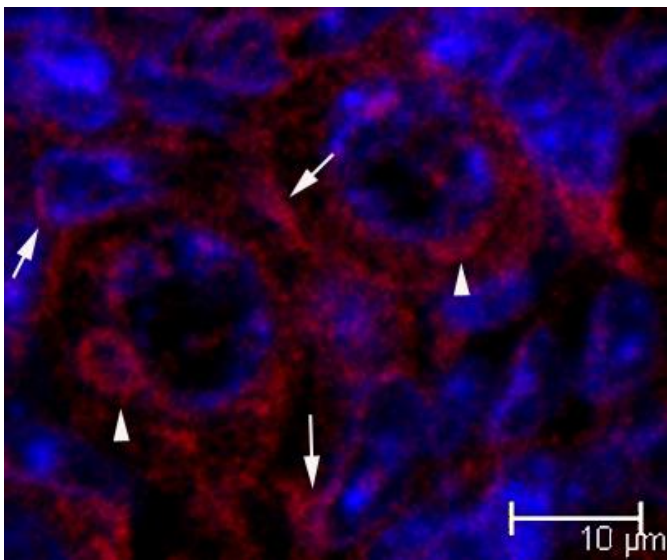
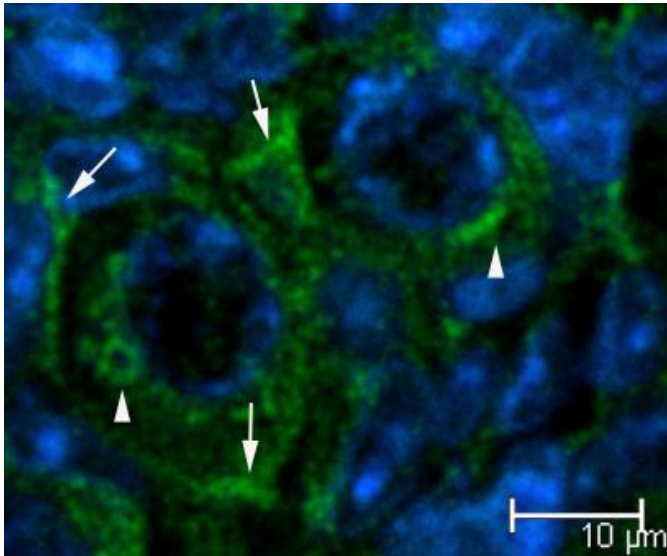
Изследвано е взаимното разположение на комплекса на Голджи и фибриларния актин в яйчникови срези от едnodневни и двудневни мишки. Сравнението на данните показва характерни разлики, свързани с динамиката на фоликулогенезата в периода около раждането при мишка.

Комплексът на Голджи и фибриларният актин показват характерна локализация в срезите от яйчници на едnodневни и двудневни мишлета. Данните за тези овоплазмени компоненти в яйчници от едnodневни мишки са представени на Фигура 11. Получена е флуоресцентна реакция за комплекс на Голджи, показана на Фигура 11А. В овоцитите Голджи материалът е разположен в перинуклеарния район. Структурата на перинуклеарното Голджи струпване показва специфичен пръстенен или полулунен вид. Флуоресцентна реакция за Голджи материал е регистрирана и във все още запазени цитоплазмени мостове, свързващи овоцитите в пространствата между клетките.

Флуоресцентната детекция на актин е показана на Фигура 11В. В овоплазмата микрофиламентите показват положителна реакция в периферията на овоцитите, както и спрегната с Голджи имунохистохимична реакция. Специфична кръгова или полупръстеновидна структура от актин се наблюдава в близост до овоцитното ядро и обгръща перинуклеарния Голджи. Актинът е асоцииран с Голджи маркера и образува пръстен или полукръг, вероятно стабилизиращ този асиметричен овоплазмен комплекс.

Разпределението на комплекс на Голджи и на актин в овоцитната цитоплазма под формата на пръстеновидна структура е разпознато като телце на Балбиани.

Фигура 11В показва взаимното разположение на Голджи и актин при формирането на телцето на Балбиани. Ясно се вижда, че микрофиламентите образуват допълнителна кръгова или полупръстеновидна структура, която обгръща перинуклеарния Голджи.



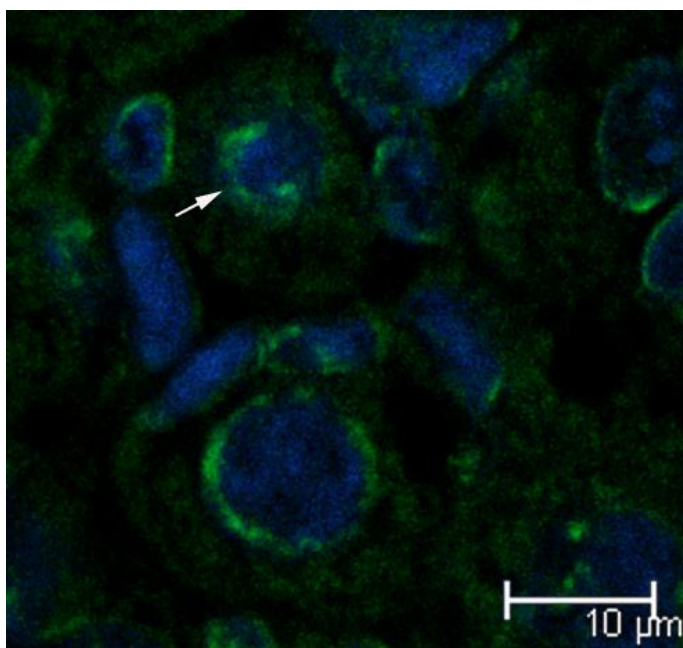
Фигура 11. Локализация на комплекс на Голджи и микрофиламенти в срез от яйчник на едnodневна мишка. Лазерна сканираща конфокална микроскопия, оригинално увеличение 1000х. Хроматинът е флуоресцентно белязан с Hoechst 33258.

11А – комплекс на Голджи, визуализиран чрез FITC. Пръстеновидното струпване странично на ядрото е посочено с глава на стрелка. Стрелките обозначават положителна реакция за Голджи материал в областта на цитоплазмените мостове между овоцитите.

11Б – реакция за фибриларен актин, белязан чрез TRITC, в същия срез. С глави на стрелки са посочени актиновите структури, които обгръщат перинуклеарното Голджи струпване. Стрелките показват присъствието на микрофиламенти в цитоплазмените мостове.

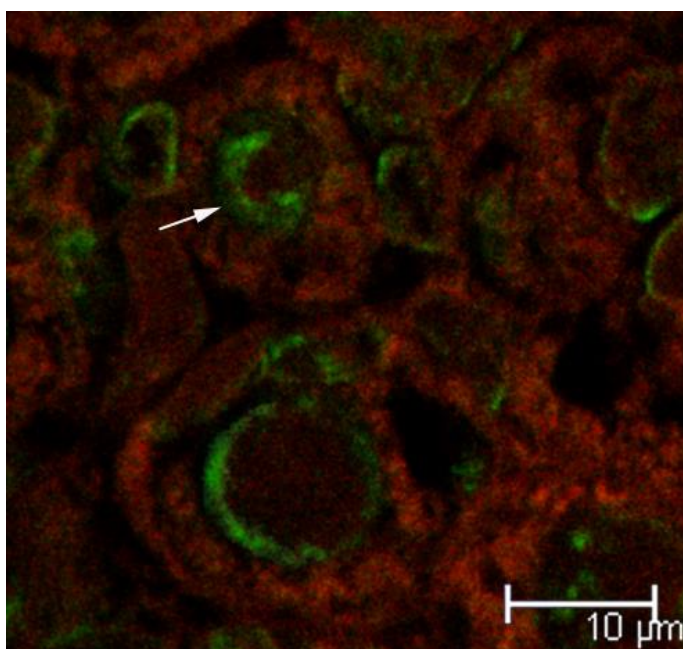
11В – едновременна визуализация на Голджи комплекс и актин в същия срез.

Локализацията на същите прицелни структури в срез на яйчник от двудневна мишка също показва асиметрично перинуклеарно разположение на комплекса на Голджи в овоцитите, но междуклетъчни мостове не се наблюдават повече, а микрофиламенти се разполагат в цитоплазмата и кортекса на овоцитите и в местата на контакт между соматичните клетки в примордиалните фоликули. Данни от лазерна сканираща конфокална микроскопия са представени на Фигури 12 и 13.



Фигура 12. Овариален срез от двудневна мишка. Стрелката показва полупръстенна конфигурация на Голджи. Местата на контакт между соматичните клетки са изразено положителни. Оригинално увеличение 1000х.

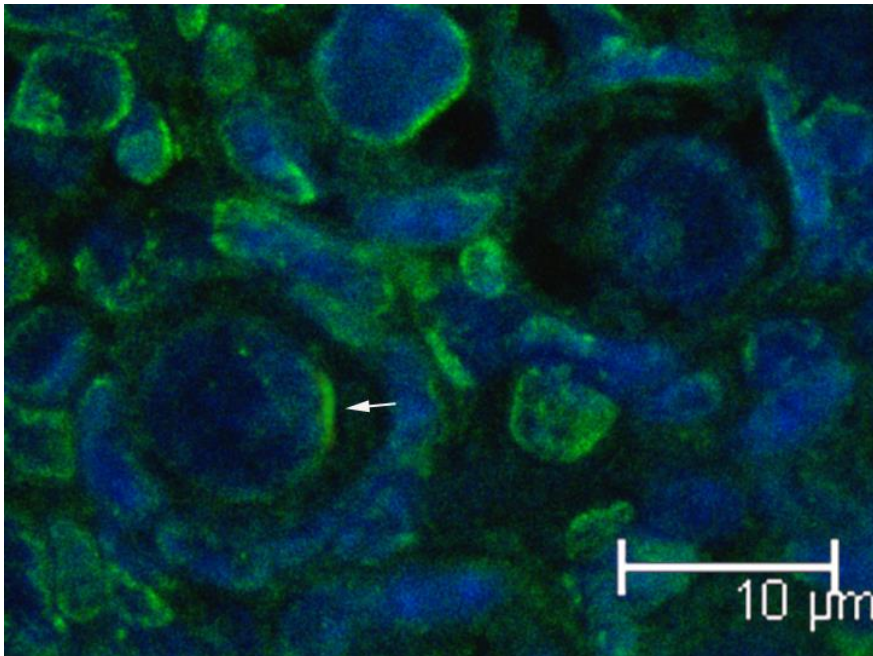
12А 12А – комбиниран образ на хроматин (в синьо) и комплекс на Голджи (в зелено).



12Б – комбиниран образ на актин (в червено) с комплекс на Голджи (в зелено).

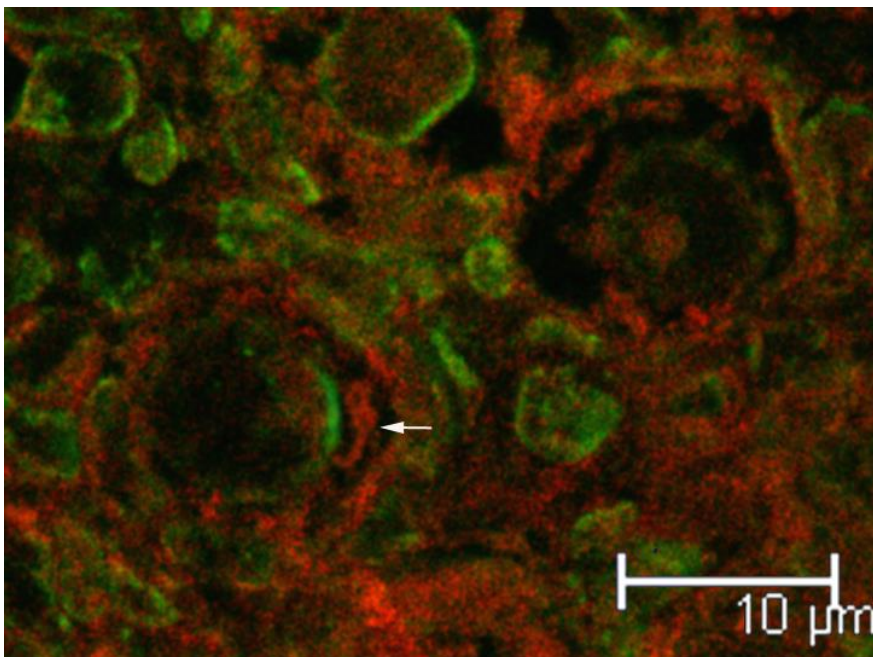
12Б

Фигура 13. Асиметрична локализация на комплекс на Голджи и актин в срез от яйчник на двудневна мишка. Стрелките показват двете овоплазмени структури с перинуклеарно разположение.



13А –  
комбиниран  
образ на  
хроматин (в  
синьо) и  
комплекс на  
Голджи (в  
зелено).

13А



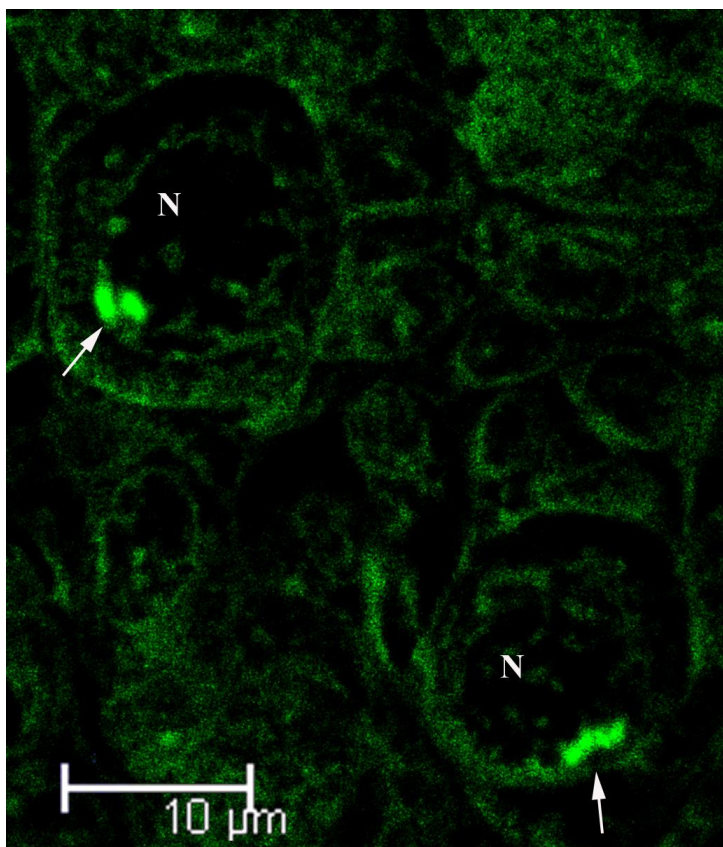
13Б –  
комбинация на  
Голджи (в  
зелено) и актин  
(в червено).  
В горната част  
от снимката се  
вижда  
положителна  
реакция за  
актин в местата  
на контакт  
между  
соматичните  
клетки.

13Б

#### **5.4. Локализация и динамика на РСМ-1 и митохондриален маркер в овариални срези от новородени мишки**

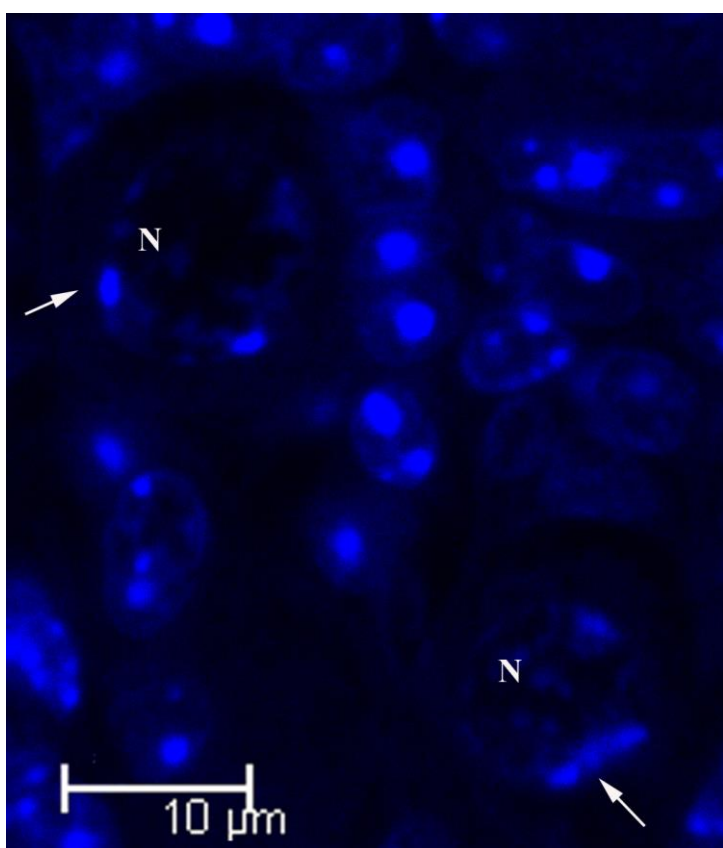
Изследването на центриолния сателитен белтък РСМ-1 е проведено в срези от яйчници от едnodневни и двудневни мишки, като неговото характерно разпределение е съпоставено с детекция на митохондриалния маркер VDAC-1. Данните от двата вида овариални срези са сравнени за установяване на динамика в разпределението на двете структури в течение на ранната овогенеза – в процеса на оформяне на примордиалните фоликули.

В овариалните срези от едnodневни мишки е установена специфична локализация на РСМ-1 като асиметричен агрегат близо до ядрото. Забелязва се пространствена асоциация на перинуклеарния РСМ-1 със струпване на кондензиран хроматин, прилежащ към периферията на овоцитното ядро. Видът на РСМ-1 агрегата варира – среща се както под формата на двойна, така и като по-широка единична структура. В някои от срезите се наблюдават два флуоресцентни сигнала за РСМ-1, асоциирани с кондензиран хроматин, но на разстояние един от друг.



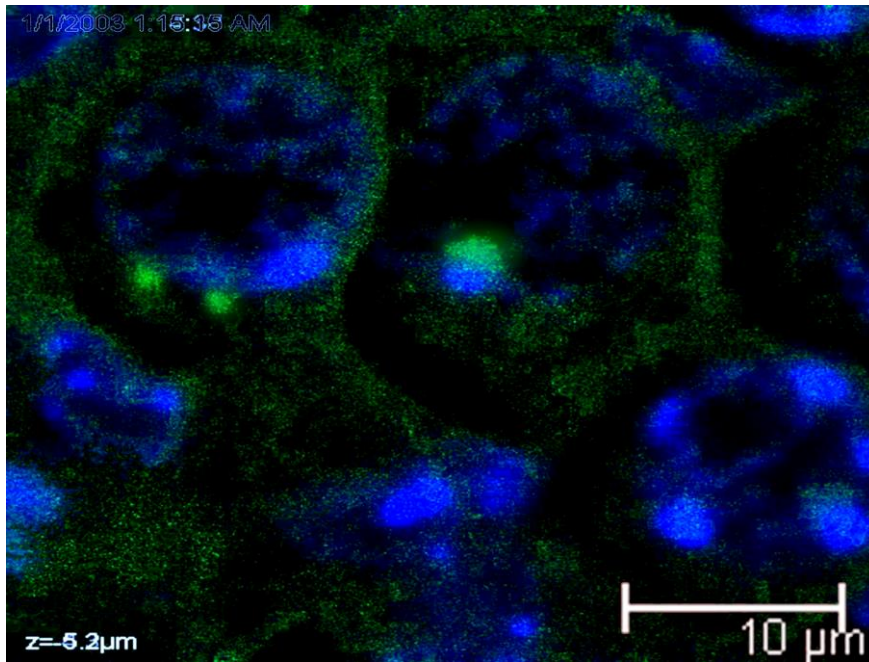
Фигура 14. Дискретни RSM-1 агрегати периферно на овоцитното ядро. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на срез от яйчник на едnodневна мишка. Оригинално увеличение 1000x.

14А - широк единичен и двоен RSM-1 агрегати са визуализирани чрез FITC и са означени със стрелка, а овоцитните ядра са означени с N.



14Б - ядрата на същите овоцити (означени с N) показват райони с различна степен на кондензация на хроматина. Стрелките показват кондензирани хроматинови участъци с вероятна пространствена връзка с RSM-1 агрегатите.

Локализацията и разпределението на митохондриалния маркер VDAC-1 показва тясна асоциация с центриолния сателитен белтък РСМ-1 в овоцитите от едnodневни мишки. Флуоресцентна реакция за VDAC-1 е установена и в областта на контакт на овоцита със съседна клетка.

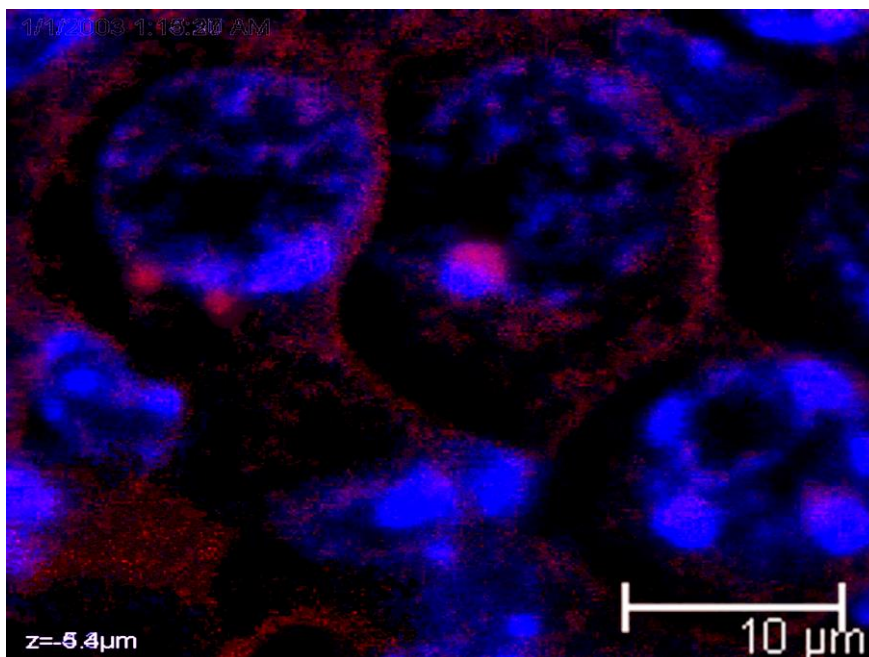


Фигура 15.  
Комбинирани  
образи на  
хроматин  
(визуализиран с  
Hoechst 33258) с  
PCM-1(15А, в  
зелено) и  
VDAC-1 (15Б, в  
червено) в срез  
от едnodневна  
мишка.

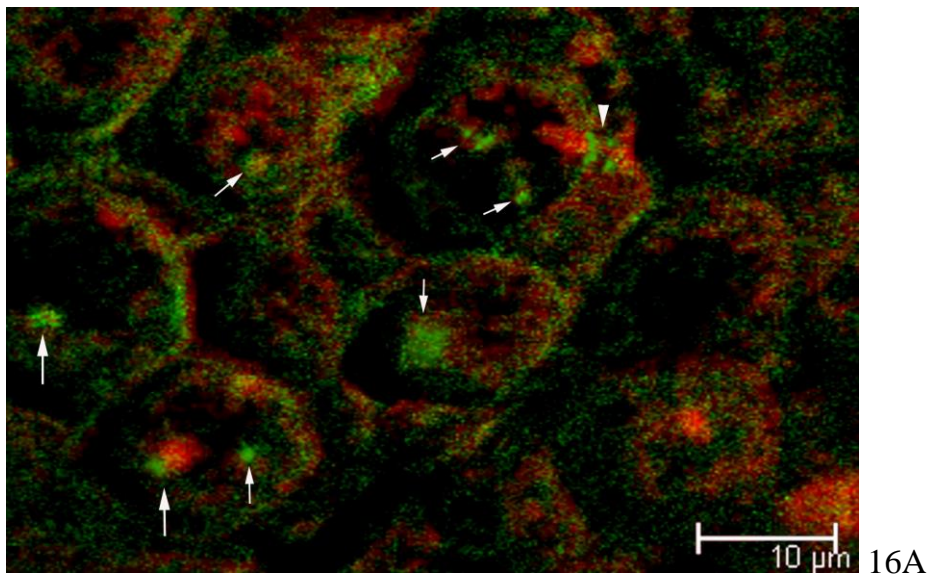
15

А Наблюдават се  
двоен и  
единичен  
агрегат на РСМ-  
1,  
колокализираш  
и със струпване  
на VDAC-1.  
Лазерна  
сканираща  
конфокална  
микроскопия,  
оригинално  
увеличение  
1000х.

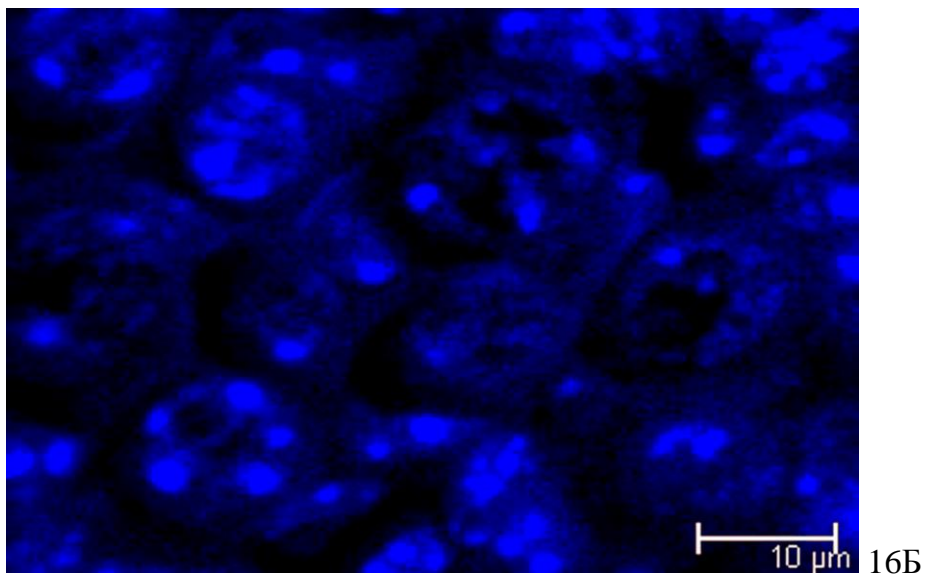
15Б



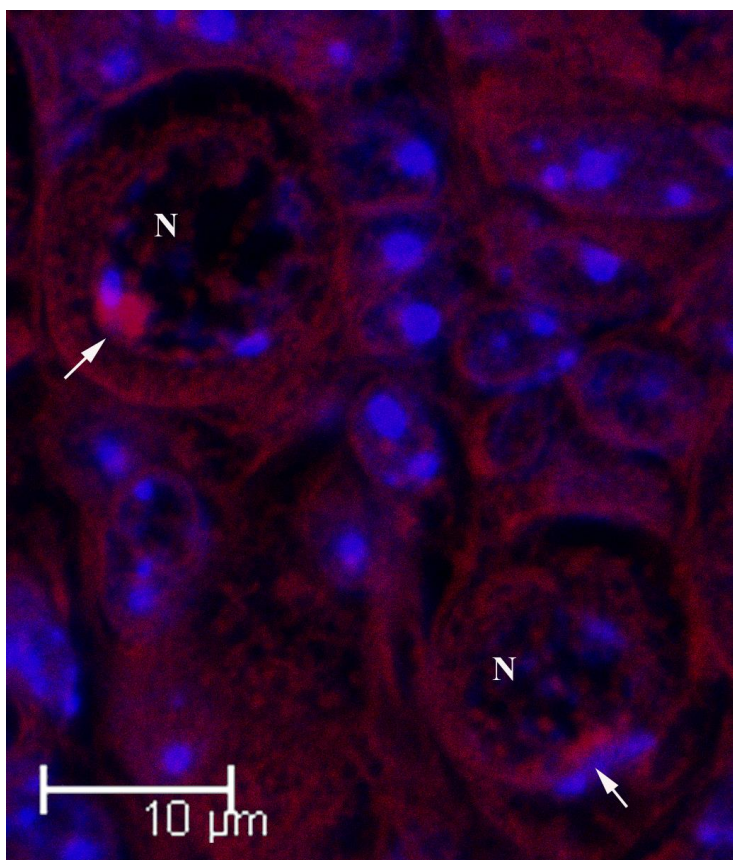
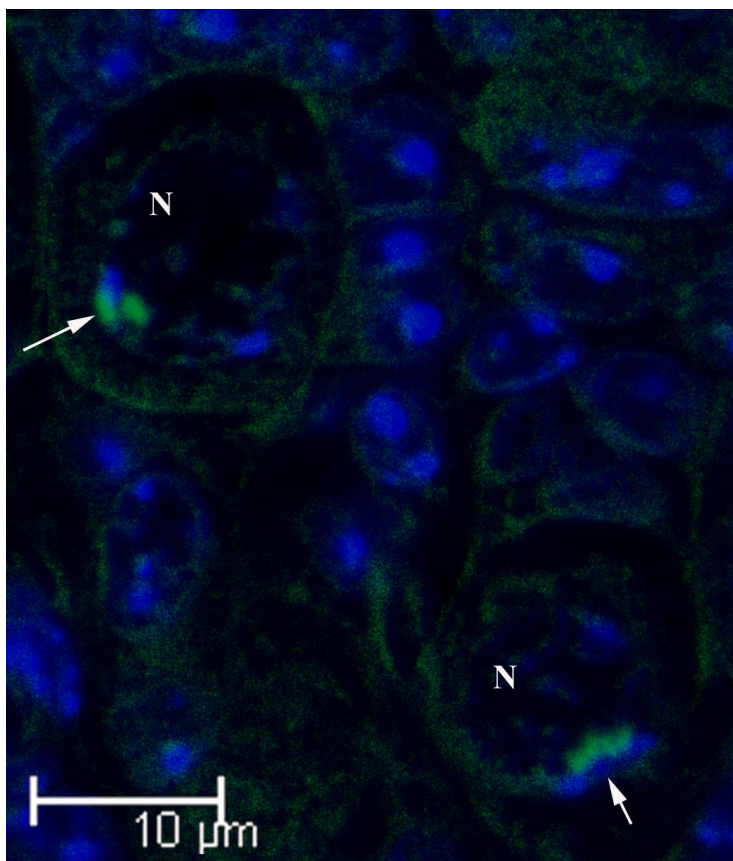
Фигура 16. Паралелна визуализация на PCM-1 и VDAC-1 в срез от едnodневна мишка.



16A – двойни и единични агрегати на центриолния сателитен белтък PCM-1 (в зелено) са означени със стрелки, а в червено (белязан с TRITC) е митохондриалният маркер VDAC-1. С глава на стрелка е показан контакт на овоцита със съседна клетка, в който има специфична флуоресцентна реакция за двете прицелни структури.



16B – лазерна сканираща конфокална микроскопия, Nuechst 33258

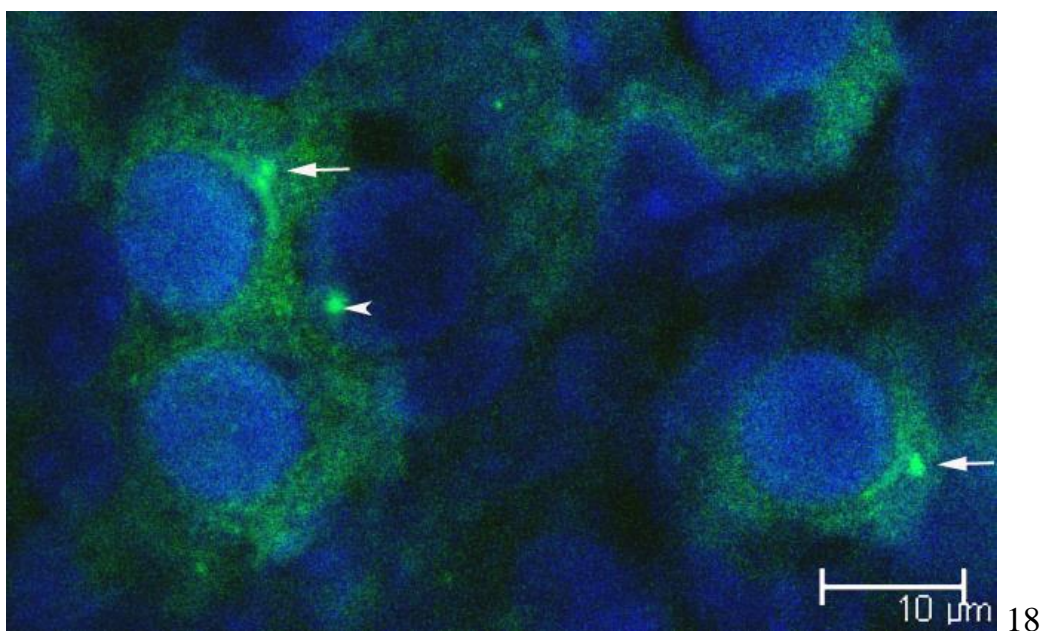


Фигура 17.  
 Едновременна локализация на хроматин (в синьо) с PCM-1 в зелено (А) и с VDAC-1 в червено (Б). Агрегатът на митохондриите (асоцииран с този на PCM-1) има различна интензивност в различните овоцити: в горния е по-едър от този на PCM-1, докато в долния е по-малък. Разликата се дължи на равнината на оптичния срез. Същият срез е показан и на Фигура 14 само за PCM-1.

17Б

В срезите на яйчници от двудневни мишки разпределението на центриолния сателитен белтък РСМ-1 и митохондриалния маркер VDAC-1 показва разлики, свързани с по-напредналия етап от оформянето на примордиалните фоликули. Разликите са значителни, въпреки краткия 24-часов интервал. В овоцитите, които прогресивно навлизат в периода на мейотичен арест (dictyate), хроматинът е хомогенен, реакцията за РСМ-1 е по-слабо дискретна, а разпределението на митохондриалния маркер става по-дифузно и асоциацията му с РСМ-2 отслабва.

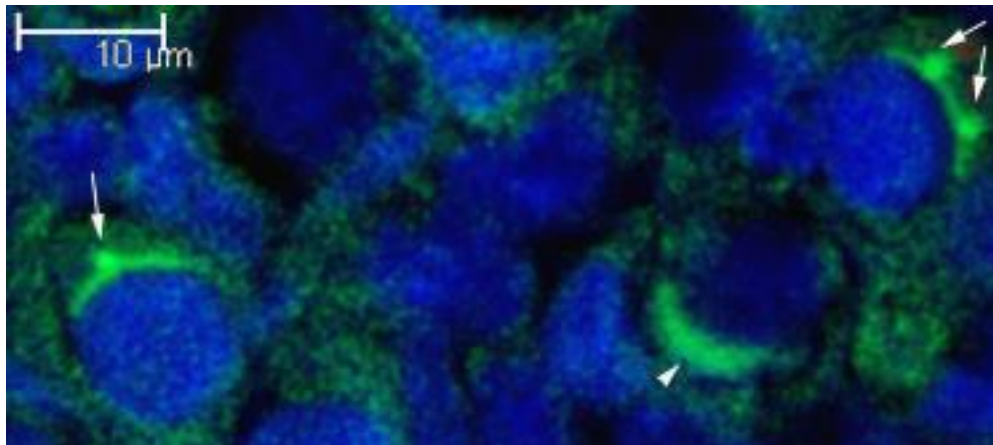
В срезите от двудневни мишки флуоресцентната реакция за РСМ-1 показва сърповидна структура, която покрива частично ядрото. Подобен вид на структурата в среза предполага разстилане върху част от овоцитното ядро и вероятно е под формата на шапка. Сърповидният РСМ-1 е равномерен и относително еднороден при някои овоцити, докато при други все още присъства малък единичен или двоен агрегат (Фигура 18).



Фигура 18. Комбиниран изглед на РСМ-1 с хроматин в срез от двудневен яйчник. В два от овоцитите сърповидната структура на РСМ-1 включва и малък единичен агрегат (стрелките ги указват), а един овоцит има само единичен агрегат, показан чрез глава на стрелка.

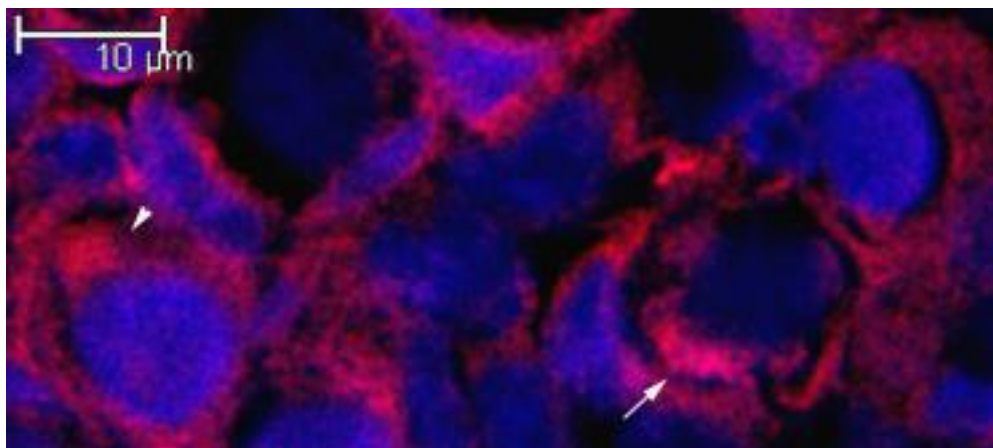
Митохондриалният маркер VDAC-1 при двудневни мишки не показва повече тясна асоциация с РСМ-1 и се наблюдава на по-широка площ, като при някои овоцити все пак е съсредоточен от едната страна на ядрото, а при други има дифузно разпределение в овоплазмата. Характерният вид на РСМ-1 и разпределението на VDAC-1 в овоцитите са представени на Фигура 19.

Фигура 19. Лазерна сканираща конфокална микроскопия – срез от яйчник на двудневна мишка. Оригинално увеличение 1000х.



19А

19А – стрелките указват РСМ-1 структура със сърповиден вид (в зелено), в която се наблюдават единичен или двоен агрегат. С глава на стрелка е показана равномерна РСМ-1 структура.



19Б

19Б – реакция за VDAC-1 (в червено). Стрелка сочи перинуклеарно струпване на митохондрии, а глава на стрелка – по-дифузно разпределение.

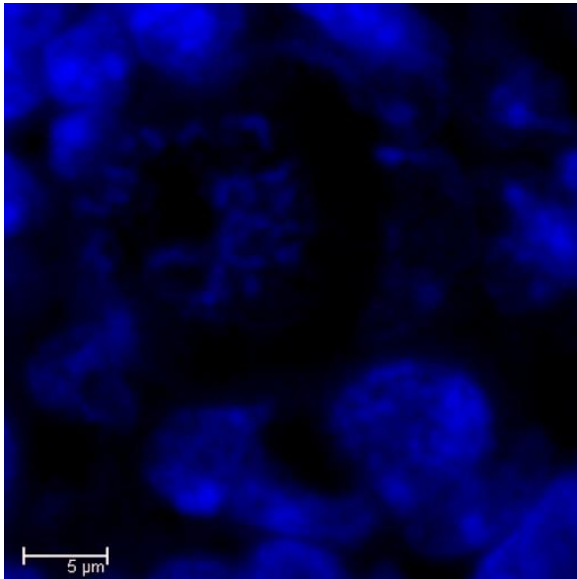
## **5.5. Сравнение на локализацията на РСМ-1 и интермедиерни филаменти в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки**

Едновременната визуализация на РСМ-1 и интермедиерни филаменти цели да установи взаимното разположение на двата вида структури по време на ранната фоликулогенеза. Взаимодействието на центриолния сателитен протеин РСМ-1 с цитокератини и виментин носи важна информация за формирането и поддържането на асиметрията в овоцитите при формирането на примордиални фоликули.

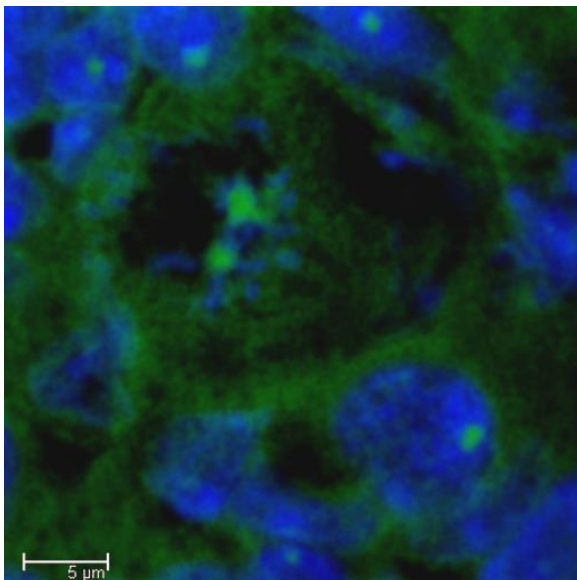
### **Цитокератини**

В срезите от яйчници на едnodневни мишки цитокератините показват пространствена връзка с РСМ-1, като при това оформят овална структура с перинуклеарна позиция. Тази асиметрична спрямо ядрото позиция и овалната форма на структурата, която дава специфична флуоресцентна реакция за цитокератини, дава основание да я разпознаем като част от телцето на Балбиани. Цитокератините показват флуоресцентна реакция и в кортикалната цитоплазма на овоцита, както и в соматичните клетки.

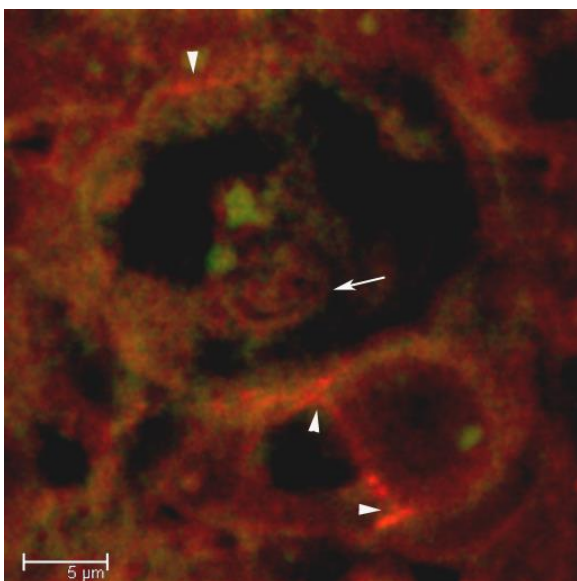
Визуализацията на реакция за цитокератини и РСМ-1 е представена на Фигура 20. На нея е представен единичен фоликул, в който реакцията за РСМ-1 е под формата на двоен агрегат, асоцииран с хроматина на овоцита (20Б). Реакцията за цитокератини показва както колокализация с РСМ-1, така и овална цитокератинова структура в непосредствена близост и свързана с него. Оптичният срез, показващ структурата на РСМ-1 и цитокератините, е комбиниран с различен оптичен образ, на който хроматинът е най-ясен. Така перинуклеарната позиция на комплекса РСМ-1 и цитокератини е съпоставена с хроматин в различна позиция. Резултатът доказва както участието на цитокератини в телцето на Балбиани, така и връзка между тях и РСМ-1.



20А



20Б



20В

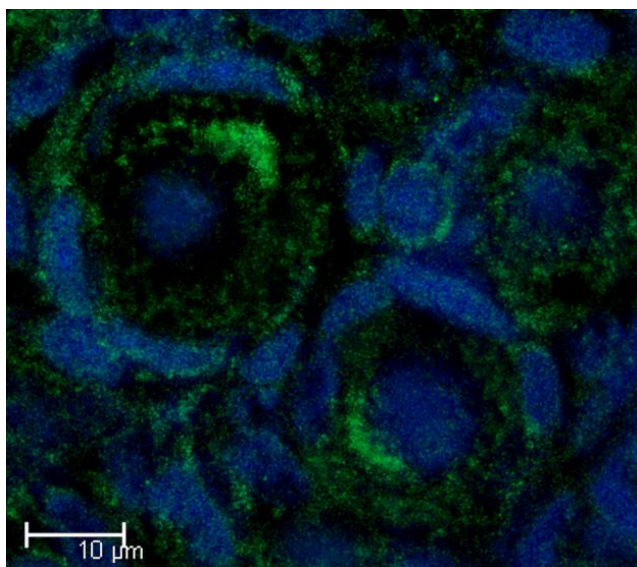
Фигура 20. Лазерна сканираща конфокална микроскопия за визуализация на цитокератини и РСМ-1 в срез от яйчник на едnodневна мишка. Оригинално увеличение 1000х. Бар = 5 микрометра.

20А – визуализация на хроматина чрез Hoechst 33258. В овоцита се вижда ясно нишковиден хроматин, а самата яйцеклетка е частично обградена от соматични клетки, някои от които едри и/или вретеновидни.

20Б – реакция за РСМ-1, белязан с FITC. Двойният агрегат показва асоциация с хроматина, а по-дифузната реакция оформя по-широка структура, свързана с цитакератиновия пръстен.

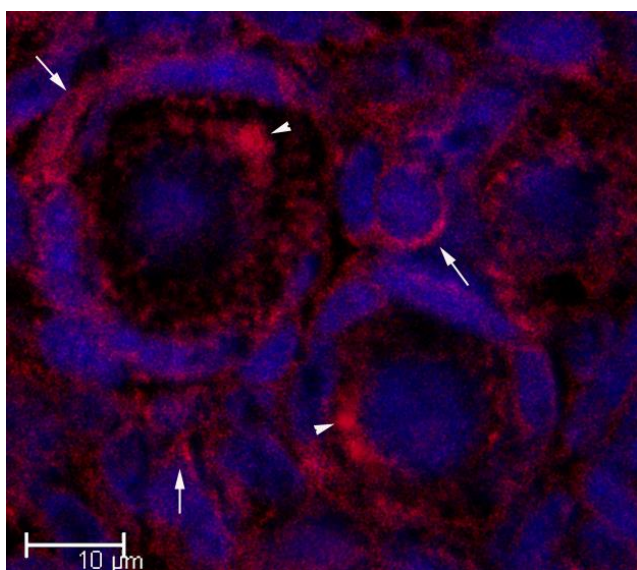
20В – комбиниран образ на РСМ-1 и цитокератини, белязани с TRITC. Наблюдава се колокализация на двете реакции в областта на двойния агрегат, както и пръстеновидна цитокератинова структура на телцето на Балбиани (показана със стрелка). Ясна реакция за цитокератини се вижда в овоцитния кортекс, както и в соматична клетка с цитоплазмени връзки със съседните (показани с глави на стрелки).

В срезите от яйчници на двудневни мишки съпоставянето на цитокератините и РСМ-1 показва значителна разлика спрямо резултатите при едnodневните. Структурата на РСМ-1 е в съответствие с данните за неговата организация на този етап от ранната фоликулогенеза. Реакцията за цитокератини се разпростира като полукръг от едната страна на ядрото, но в по-малка степен от тази за центриолния сателитен белтък. При това структурата, която цитокератините формират, изглежда леко зърниста и образувана от отделни по-малки агрегати. Ясна реакция има и в овоцитния кортекс, както и в периферията на соматичните клетки и в местата на контакти между тях. Данните за разпределението на цитокератини и РСМ-1 са представени на Фигура 21.



Фигура 21. Лазерна сканираща конфокална микроскопия за визуализация на цитокератини и РСМ-1 в срез от яйчник на двудневна мишка. Оригинално увеличение 1000x.

21А – комбиниран образ на хроматин (в синьо) и РСМ-1 (в зелено). Снимката показва два равномерни, сърповидни агрегата, прилежащи към овоцитните ядра.

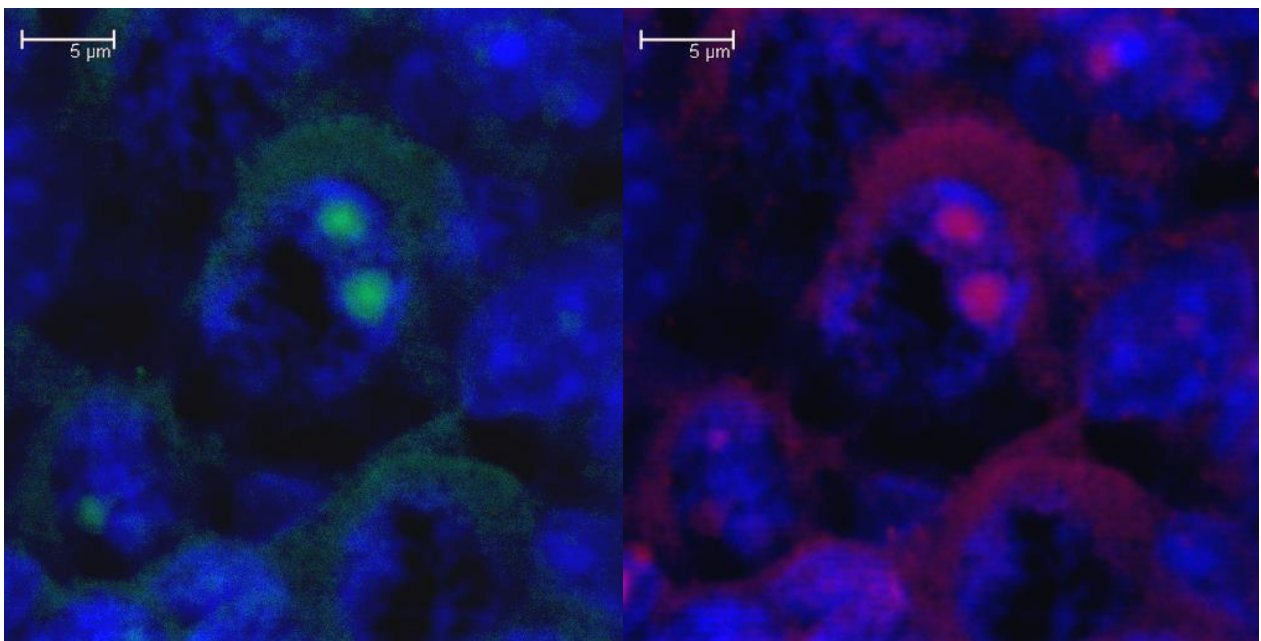


21Б - комбиниран образ на хроматин (в синьо) и цитокератини (в червено). Реакцията за цитокератини в овоцитите под формата на зърнисти агрегати, отчасти колокализиращи с РСМ-1 агрегатите, са посочени с глави на стрелки. Реакцията в соматичните клетки и контактите между тях са показани със стрелки.

## Виментин

Наличието и вътреклетъчното разпределение на виментина е изследвано и сравнено с това на центриолния сателитен белтък РСМ-1 в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки. Сравнението показва разлики в асоциацията на виментина с РСМ-1, както и разлики, свързани със специфичния момент от процеса на образуване на примордиалните фоликули в неонаталния яйчник.

Особеност в реакцията за виментин в срези от яйчници на едnodневни мишки е тясната му асоциация с РСМ-1 агрегатите и присъствието му в цитоплазмата на овоцитите, както показва Фигура 22.

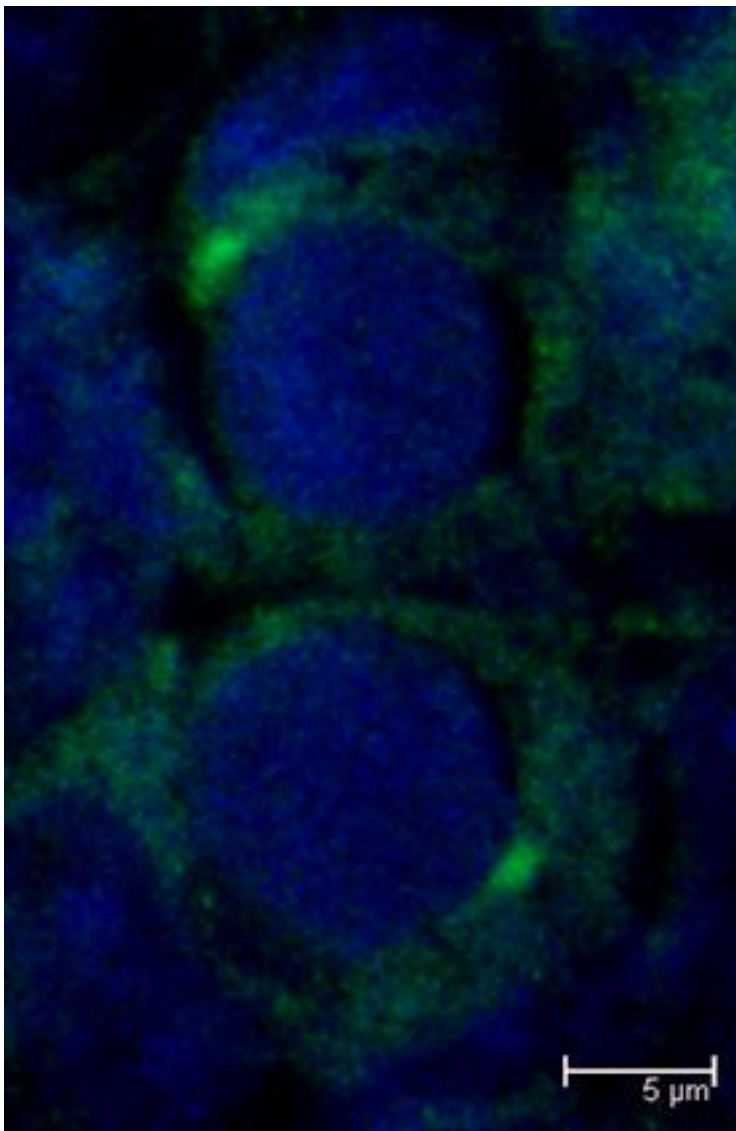


22А

22Б

Фигура 22. Паралелна визуализация на РСМ-1 (22А, боязан със зелен флуорохром FITC) и виментин (22Б, боязан в червено с TRITC).

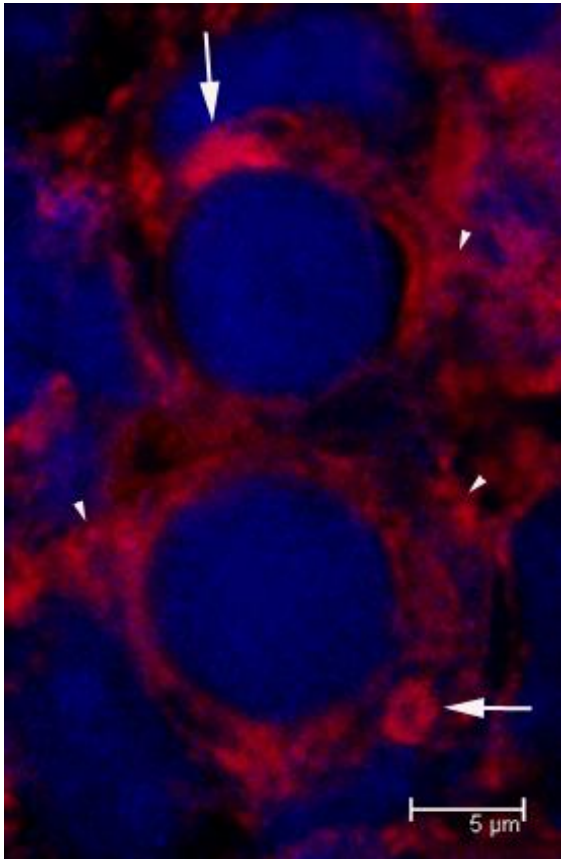
В срезите от яйчници на двудневни мишки виментинът частично запазва своята асоциация с РСМ-1 в овоцитите, като засилена реакция за виментин се наблюдава в непосредствена близост с РСМ-1 и овоцитното ядро. Виментинът показва флуоресцентна реакция в овоплазмата, както и в цитоплазмата на соматичните клетки и в местата на контакт между тях. Разпределението на виментин, съпоставено с РСМ-1 в яйчниците на двудневни мишки е показано на Фигура 23.



Фигура 23. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на срез от яйчник на двудневна мишка за визуализация на виментин и РСМ-1. Реакцията за РСМ-1 е в зелено (чрез FITC), а тази за виментин – в червено (чрез TRITC).

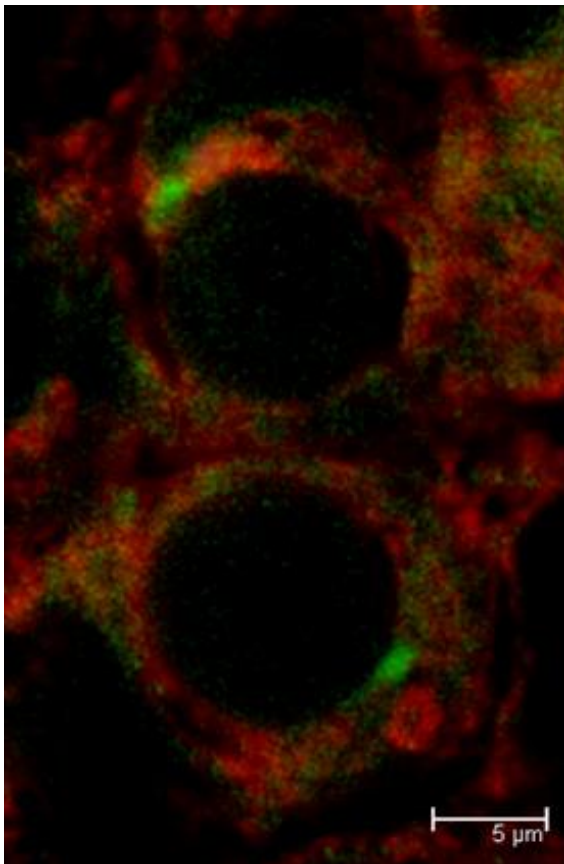
23А – два примодиални фоликула в яйчник от двудневна мишка с единични агрегати РСМ-1.

23А



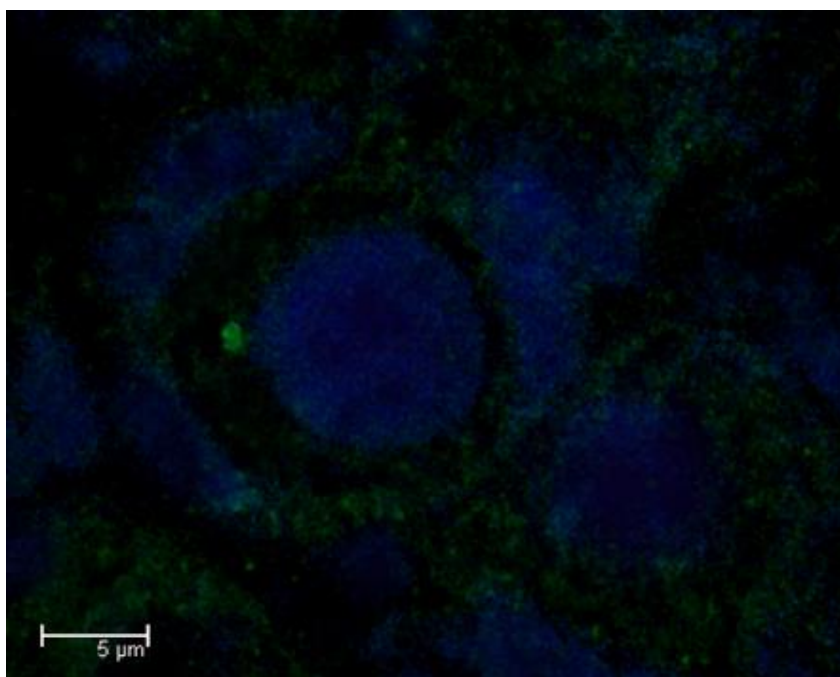
23Б

23Б – същите фоликули с реакция за виментин в близост с РСМ-1 агрегатите (показани със стрелки), в овоплазмата. Контактите между клетките с реакция за виментин са показани с глави на стрелки.

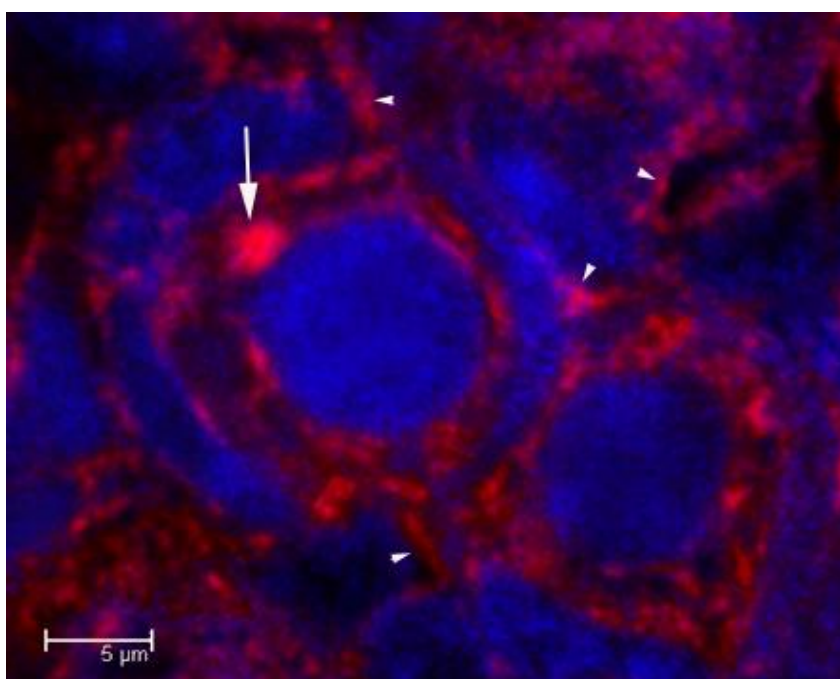


23В

23В – комбиниран образ на РСМ-1 и виментин.



23Г – единичен перинуклеарен РСМ-1 агрегат в овоцит от примордиален фоликул на двудневна мишка.

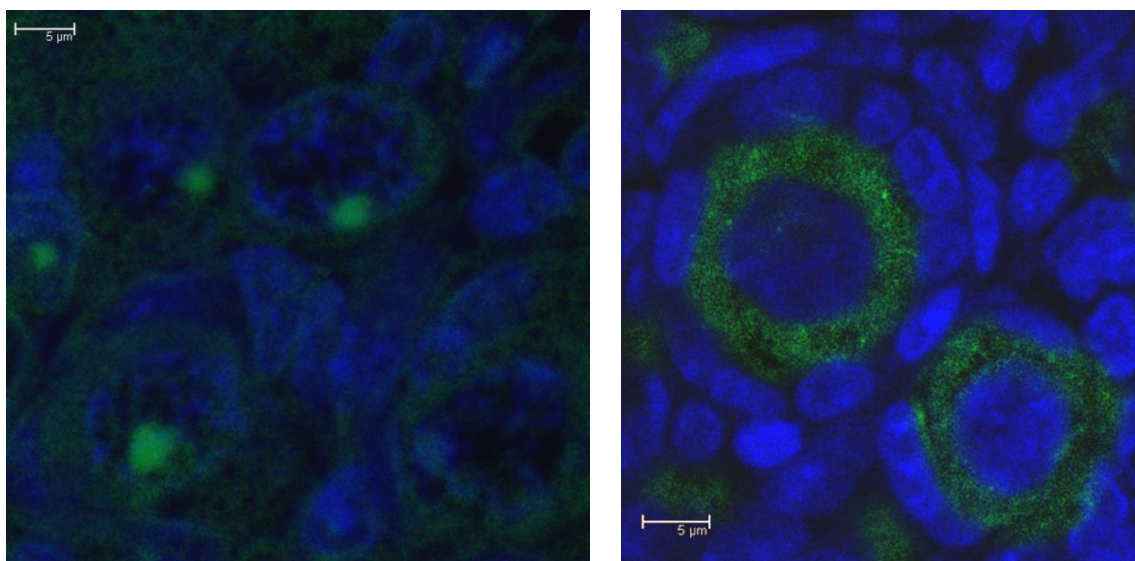


23Г 23Д – струпване на виментин встрани от РСМ-1 (стрелката) в същия фоликул. Реакция за виментин в местата на контакт между клетките, посочена с глави на стрелки.

## 5.6. Експресия на маркер за зародишна герминативна линия в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки

Маркерен белтък за герминативна клетъчна линия DDX4 е изследван в двата вида овариални срези. В яйчниците на едnodневните мишки той се експресира в овоцитната цитоплазма, като образува струпване в периферията на ядрото, вероятно като част от телцето на Балбиани. В срезите от двудневни мишки маркерът проявява ясна овоплазмена локализация с хомогенен вид. Данните са представени на Фигура 24.

Фигура 24. Визуализация на маркерен белтък за герминативни клетки DDX4 чрез FITC.

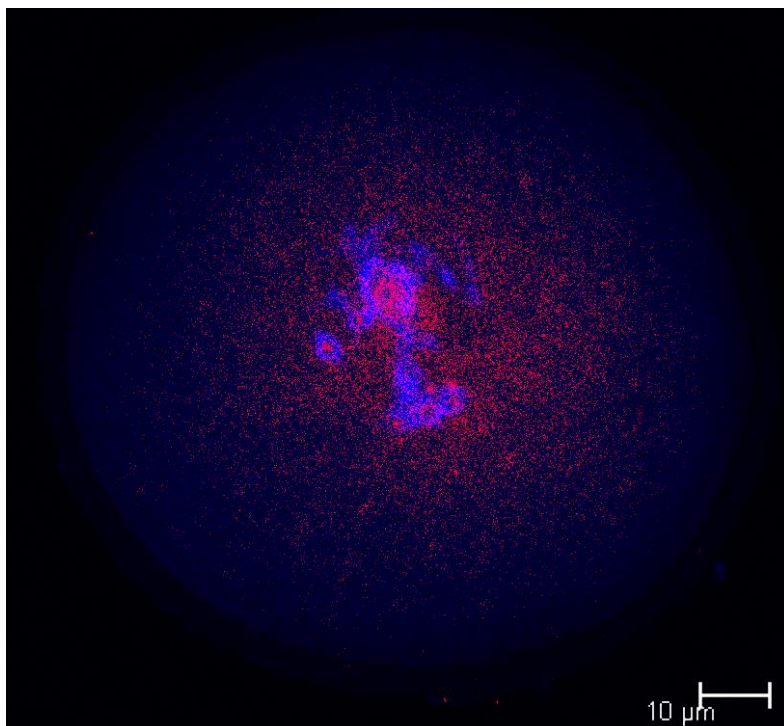


24А – разпределение в овоплазмата и в перинуклеарно струпване в срез от едnodневна мишка. 24Б – овоплазмена реакция в срез от двудневна мишка.

### **5.7. Локализация и динамика в разпределението на РСМ-1 по време на мейотичното зреене на миши овоцити**

Белтъкът РСМ-1 на центриолните сателити беше изследван и в зреещи миши овоцити. Установена беше специфичната му локализация и динамиката в разпределението му в хода на мейотичното зреене в следпубертетния яйчник. Проследени са характерни стадии: възобновяване на мейозата след dictyate на профаза I, метафаза I, телофаза I и метафаза II на овоцитното зреене.

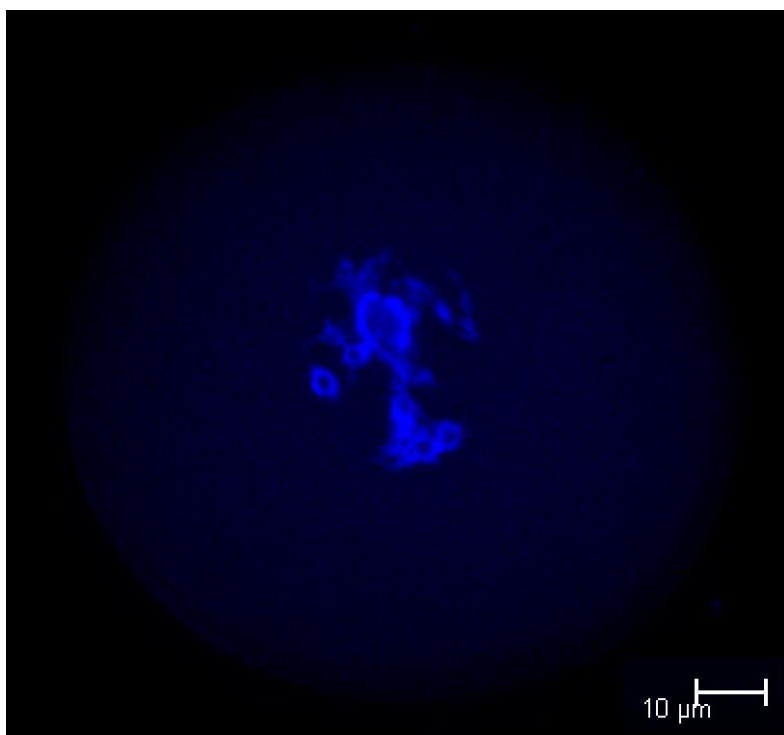
При възобновяването на мейотичното зреене в мишия следпубертетен яйчник перицентриоларният белтък РСМ-1 образува две струпвания периферно на кондензиращия се хроматин. Разпределението му е показано на Фигура 25. Ясно се вижда напредваща кондензация на хроматина и визуализиране на овоцитните хромозоми, кореспондиращо с диакинетичния период на мейотичната профаза I: конюгиращите хромозоми са свързани чрез хиазми. Центриолният сателитен белтък РСМ-1 образува две сравнително дифузни струпвания в различни планове на оптичните срези – едно под хроматиновата група и едно над нея, като проявява склонност да се асоциира частично с хроматина.



25А

Фигура 25. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на миши овоцит в диакинеза от профаза I на мейозата.

25А - монтирани оптични срези за едновременна визуализация на РСМ-1 (белязан с TRITC) и овоцитните хромозоми (оцветени с Ноеchst 33258). Наблюдават се центрове на акумулиране на РСМ-1, съответстващи на хроматина.

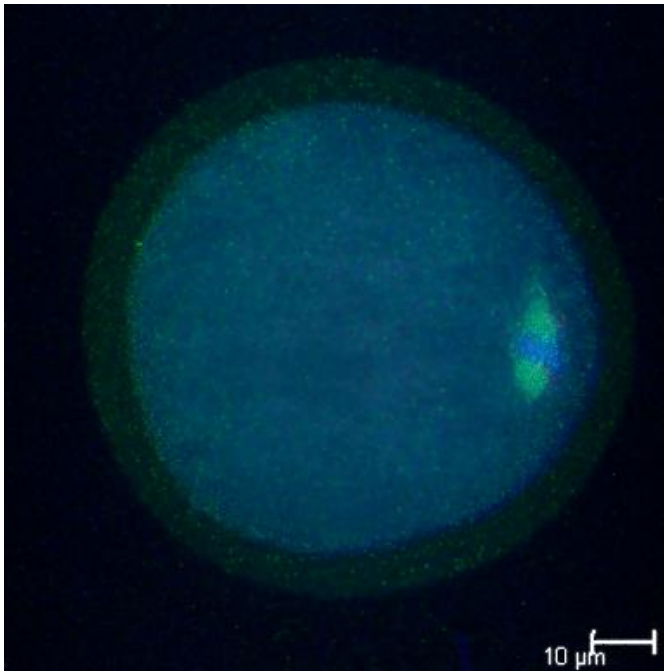


25Б

25Б - изглед на хромозомите, свързани чрез хиазми.

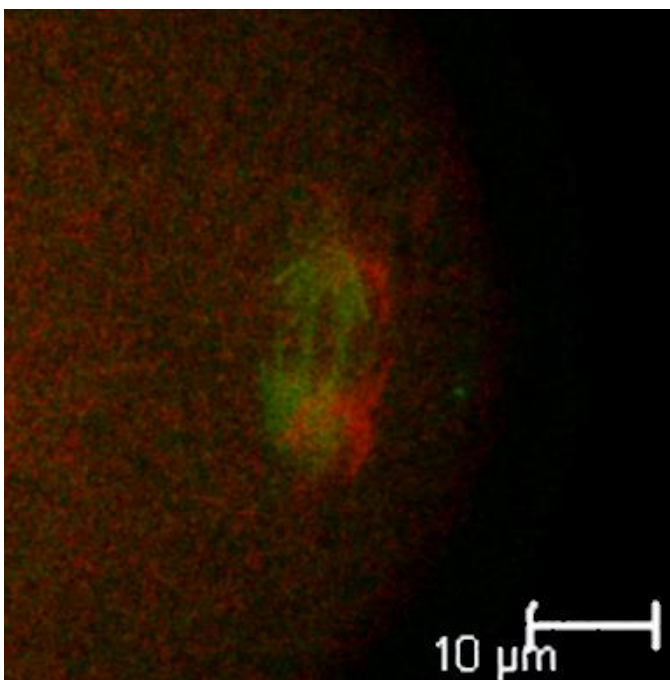
С напредването на мейотичното зреене белтъкът РСМ-1 се асоциира с микротубулите на мейотичното вретено по различен начин. В метафазното вретено той не остава само в полюсите, а се локализира и по дължината на микротубулите с предпочитание към кортикалната повърхност на вретеното. Фигура 26 показва асоциацията на РСМ-1 с тубулиновите нишки на мейотичното вретено.

Фигура 26.



26А

26А - овоцит в метафаза I: алфа-тубулинът е боязан в зелено, а хроматинът – в синьо.

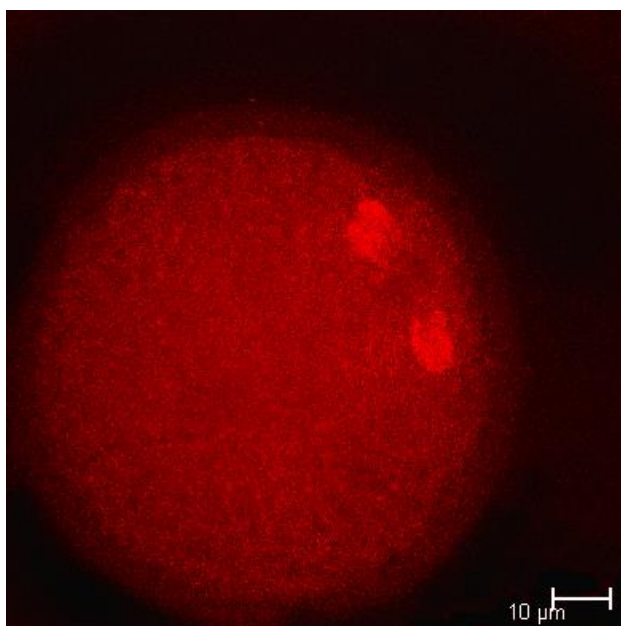


26Б

26Б – увеличен изглед на вретеното, представен чрез монтирани оптични срези. Съпоставени са тубулиновите нишки с компонента на центриолните сателити РСМ-1 (в червено).

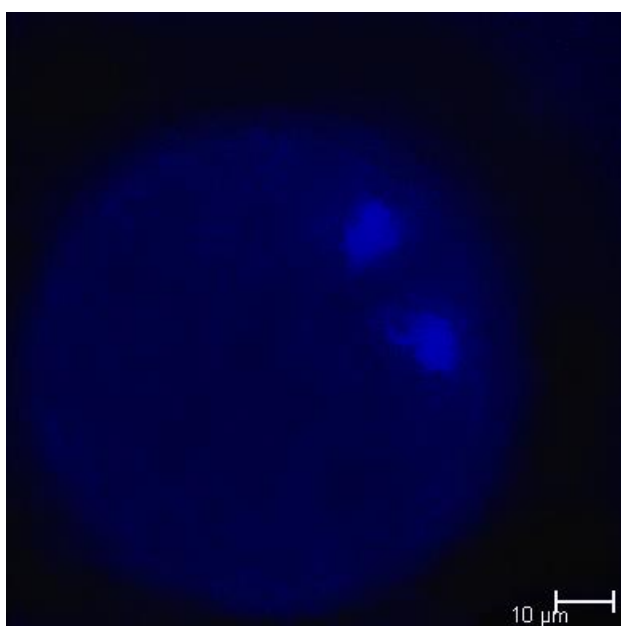
С настъпването на телофаза I центриолният сателитен белтък PCM-1 се изтегля към полюсите на вретеното, асоцииран повече с хроматина, отколкото с разпадащото се мейотично вретено. На Фигура 27 е показана мейотична телофаза I с имунофлуоресцентна реакция за PCM-1 в областта на двете хроматинови групи – една за овоцита и друга с предстоящо отстраняване чрез отделяне на първото полярно телце. Отново се наблюдава леко изместване на реакцията към периферията на клетката.

Фигура 27. Овоцит в мейотична телофаза I.



27А - визуализация на PCM-1 чрез TRITC. Наблюдава се изтегляне на PCM-1 към полюсите на вретеното, обвързано с разделящия се хроматин и разпадането на вретеното, и леко изместване на реакцията към клетъчната периферия.

27А



27Б – визуализация на хроматина чрез Hoechst 33258

27Б

Въз основа на настоящите данни може да се допусне участие на РСМ-1 в установяването на ясната цитоплазмена асиметрия по време на прехода метафаза I – метафаза II, изразяваща се в периферно разположение на мейотичното вретено и осъществявана с участието на различни цитоскелетни белтъци. За категорично заключение по този въпрос обаче са необходими по-обстойни изследвания.

## **6. Обсъждане**

### **6.1. Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули**

Зародишите на плацентни бозайници, в които всички изучени процеси на клетъчно диференциране се направляват чрез ембрионална индукция, са краен пример за регулативно развитие (Gilbert, 2000). Ето защо към настоящия момент е трудно да се припише функция на преходната структурна асиметрия, която по литературни данни е присъща на определени стадии от овогенезата и се изразява най-ясно в изграждането на телце на Балбиани. Когато се търси функционалното значение на наблюдавана структурна особеност в жив обект, патологичните промени могат да предоставят ценни данни. Тези съображения обосноваха изследванията, при които клетъчни компоненти бяха локализирани в овариални проби от пациентки със синдром на поликистозните яйчници (PCOS).

Овариалната поликистоза е относително широко разпространена – засяга най-малко 12% от жените в репродуктивна възраст и значително по-голям процент при тези с наднормено тегло. Тя е нарушение със засега неясна (вероятно генетична) етиология и ендокринна патогенеза, чиято основна характеристика е повишената секреция на андрогени (March et al., 2010; Boyle and Teede, 2012). Нормално при човека във фоликулната фаза на всеки менструален цикъл един фоликул става доминантен, продължава растежа си за сметка на останалите и стига до овулация. Хиперандрогенемията обаче разстройва регулацията на фоликулния растеж, в резултат на което поликистозният яйчник се характеризира със значително по-голям брой растящи фоликули, но голяма част от менструалните цикли протичат без овулация, което силно намалява вероятността за естествено зачеване (Rotterdam ESHRE / ASRM-sponsored PCOS workshop group, 2004). Тези данни подчертават важността на изследванията върху поликистозния яйчник. Поради социалната значимост на заболяването и обяснимия интерес към него различни колективи са провели

голям брой изследвания. Резултат от тях е подробната характеристика на аномалиите в хуморалното и клетъчно микроокръжение на поликистозния яйчник (Boyle and Teede, 2012). Колкото и да е странно обаче, все още липсват достатъчно данни за промените в клетките, заради чието производство съществува яйчникът – самите овоцити. В литературата могат да се открият твърдения за цялостно влошаване на овоцитната морфология и функция (Eini et al., 2017), за засягане на отделни овоцитни компоненти като митохондриите (Jia et al., 2016) или за нормални показатели на овоцитите (Sigala et al., 2015). Тези противоречия показват необходимостта от изследвания, насочени конкретно към клетъчните и молекулни аспекти на заболяването и в частност към свързаните с PCOS промени в структурата и функцията на овоцитите.

Изследователският колектив има траен интерес към биологичните аспекти на овариалната поликистоза при човека – провеждал е изследвания върху хроматина и хромозомния набор на овоцити от поликистозни яйчници (Живкова и сътр., 2009) и оценка на яйчниковия резерв (Пъневска и сътр., 2011). Настоящото изследване беше насочено към евентуалното наличие на асиметрия и полярност в овоцити, която по литературни данни се очакваше да се открие в овоцитите в покой, намиращи се в примордиални фоликули, и да се изразява в наличие на телце на Балбиани. За имунохистохимична локализация измежду клетъчните компоненти, локализирани в телцето на Балбиани, бяха избрани белтъците на цитоплазмените интермедиерни филаменти. Те се отличават с механична устойчивост, ясно изразена тъканна специфичност и зависимост от диференцирането и функционалното състояние на клетката, поради което често се използват като показатели за патологични промени в различни типове клетки (Eriksson et al., 2009; Strnad et al., 2012). Литературни данни сочат присъствие на цитокератини и виментин в телцето на Балбиани (Santini et al., 1993; Rodler and Sinowatz, 2013), а по-ранни имуноцитохимични изследвания на членове на екипа разкриват присъствие на кератинови и виментинови интермедиерни филаменти в зреещи миши овоцити (Markova et al., 2015; Nikolova et al., 2016). Ето защо при планирането на имунохистохимично изследване върху овариални срези от

пациентки с поликистоза бяха избрани именно тези белтъци на интермедиерните филаменти.

Общият резултат от имунолокализацията на цитокератини и виментин в овариалния срез, показана на Фигура 1, съответстваше на очаквания: изразена положителна реакция за цитокератини в целия овариален кортекс, явно отговаряща на епителните клетки, и силно светене за виментин в тясна ивица по самата периферия на яйчника, по местоположение и площ съвпадаща с богатата на съединително-тъканни клетки tunica albuginea. Детайлното наблюдение на отделните фоликули обаче показва наличие и колокализация на двата типа IF както в кумулусните клетки, така и в овоцитите. Такава находка, макар да не е типична за диференцирани клетки в обичайни обстоятелства, е описана от други автори в човешки гранулозни клетки (Santini et al., 1993) и е установена от настоящия колектив в зреещи миши овоцити и свързаните с тях кумулусни клетки (Markova et al., 2015). Наблюдаването ѝ и във фоликули от човешки яйчник показва сходство в цитоскелетната организация на клетки, участващи в овогенезата, при бозайници от различни разрези – мишка и човек.

С оглед на изследването на диференцирането на овоцитите и по-конкретно на евентуалното асиметрично разпределение на техни компоненти най-голям интерес представляваше перинуклеарно локализираният грануларен агрегат в овоцитната цитоплазма, даващ положителна реакция за двата типа белтъци на IF. Тази структура морфологично не отговаря на никой от универсалните клетъчни компоненти. Съдейки по вида и местоположението ѝ, тя явно е идентична с телцето на Балбиани. От литературата е известно, че това образувание представлява преходно перинуклеарно струпване на мембранни органели, цитоскелетни елементи, белтъци и мРНК през овоцитната профаза I. При повечето групи животни то участва в определянето на полярността в яйцата и впоследствие на пътищата на диференциране на ембрионалните клетки (Marlow, 2010). В овоцитите на бозайниците телцето на Балбиани е известен, но малко изследван и обсъждан обект, чиято роля в овогенезата засега не е установена. Намирането на функцията на слабо изучените структури често се

подпомага от анализ на промените, наблюдавани при определени патологични състояния. Ако структурата, характерна за нормалната клетка, присъства и при наличие на съответната диагноза, следва да се сравнят особеностите им при норма и при патология.

Нашите изследвания върху човешки поликистозни яйчници визуализират образуване със сходни размери и местоположение, даващо положителна реакция за цитокератини и виментин, което идентифицираме като телце на Балбиани. Доколкото ни е известно, това е първо наблюдение на телце на Балбиани при PCOS. Същевременно резултатите показват, че при овариална поликистоза телцето на Балбиани има необичайна структура, образувана от подредени в правилна форма по-малки елементи. Вместо единично телце ние наблюдаваме полукръг или кръг от гранули с приблизително еднакви размери. Гранулите реагират положително за белтъци на цитоплазмените интермедиерни филаменти (цитокератини и виментин), но от това не трябва да се прави извод, че те са изцяло цитоскелетни образувания. Много е вероятно те да включват и мембранни органели – митохондрии, цистерни на Голджи и на ендоплазмения ретикулум. Предвид на сходния вид на гранулите в много овоцити може да се предположи, че всяка от тях е „елементарна единица” на телцето на Балбиани, вероятно включваща мембранни органели от всеки от посочените типове, свързани помежду си с цитоскелетни елементи.

Видимо атипичният строеж на телцето на Балбиани навежда на предположението, че нарушената хормонална среда в поликистозния яйчник се отразява на овоцитите още на този сравнително ранен етап от диференцирането им (в dictyate в примордиалните фоликули) и причинява отклонения в морфологията им. Предвид неиязсената функция на телцето на Балбиани при бозайници е трудно да се предскаже как промените в него биха се отразили на зреенето и функционалната годност на овоцита. По-подробното изучаване на тази структура при пациентки с PCOS би могло да допринесе както за разширяване на знанията за промените, съпътстващи овариалната поликистоза,

така и за разбиране на отношението на наблюдаваните морфологични промени към изясняването на етиологията на това състояние.

## **6.2. Особенности на овогенезата и фоликулогенезата в неонатален миши яйчник – характерни морфологични разлики в срези от едnodневни и двудневни мишки**

За да получим допълнителни данни за състава, строежа и динамиката на телцето на Балбиани в овоцити от бозайници, ние се насочихме към характеризирането му в нормален яйчник на различни етапи от овогенезата. Такова мащабно изследване обаче е трудно да се проведе върху човешки яйчници поради ограничения от практическо, нормативно и етично естество. При всички положения е уместно обектът най-напред да бъде възможно най-пълно характеризирани в животински модел. Ето защо последващите изследвания бяха проведени върху опитни животни – лабораторни мишки от стандартната линия BALB/c.

Друг въпрос, който трябваше да се реши при избора на експериментален обект, засягаше възрастта на животните. В яйчниците от възрастни бозайници във всеки момент се съдържат фоликули на различен етап от развитието си. Освен примордиални фоликули с овоцити в покой, в които може да се наблюдава телце на Балбиани, неизбежно присъстват и зреещи фоликули, чийто обем е многократно по-голям. Наличието им затруднява откриването и изследването на малките примордиални фоликули. Освен това във възрастния яйчник не може да се наблюдава образуването на телцето на Балбиани, защото няма овоцити на стадий, по-ранен от dictyate (Pepling, 2006). По тези причини за повечето изследвания в настоящия дисертационен труд като обект бяха използвани овариални срези от новородени лабораторни мишки от линия BALB/c. Проби бяха вземани в два различни момента от ранния постнатален живот – на едnodневна възраст (т.е. в деня на раждането) и на двудневна възраст. Всеки изследван компонент беше локализиран в препарати както от едnodневни,

така и от двудневни яйчници. По този начин можеше да се проследи динамиката на промените в яйчника непосредствено след раждането, когато протичат важни процеси – разпадане на зародишните гнезда, възникване на примордиални фоликули и спиране на овоцитната мейоза в dictyate (Pepling and Spradling, 2001; Chen et al., 2007).

Първата серия наблюдения беше извършена с цел да се определи хистологията на яйчниците от новородените мишки и организацията на различните клетъчни типове в тях. По литературни данни в яйчника на едnodневното мишле още могат да се наблюдават зародишни гнезда, докато на двудневна възраст гнездата вече се разпадат и се образуват примордиални фоликули (Pepling and Spradling, 2001; Chen et al., 2007). Известно е обаче, че времевият ход на развитието на половата система при мишки донякъде зависи от линията (т.е. генотипа) и условията за отглеждане. Поради това беше необходимо да се провери дали яйчниците на използваните опитни животни показват очакваната динамика във времето.

Микроскопските наблюдения показаха, че в яйчниците от едnodневни мишки овоцитите имат ядра с нехомогенен хроматин, съдържащ ясно видими кондензирани участъци, особено в периферията. Това отговаряше на очакваното за активна мейотична профаза I, преди първото за овогенезата спиране в стадий dictyate. Наличието на едри соматични клетки с удължена вретеновидна форма между овоцитите беше белег, че в момента се извършва разпадане на зародишните гнезда чрез навлизане на соматични (прегранулозни) клетки между тях, за да се образуват примордиални фоликули. Соматичните клетки обаче не обгръщаха изцяло овоцитите, което показваше, че фоликулите още не са оформени. Подобна картина е описана от други колективи (Pepling and Spradling, 2001; Chen et al., 2007) като характерна за развитието на мишия яйчник непосредствено след раждането, когато отделянето от майчиното кръвообращение променя хормоналната среда и рязко ускорява разпадането на зародишните гнезда.

При мишките на двудневна възраст в овоцитите се наблюдаваше хомогенен хроматин без кондензирани участъци. Това декондензиране на хромозомите показва навлизане в dictyate и спиране на мейозата. Овоцитите бяха заградени от прегранулозни клетки, което показваше, че са вече включени в примордиални фоликули. Това отговаря на данните на други автори за яйчници на тази възраст (Chen et al., 2007; Pepling et al., 2010).

Както в едnodневните, така и в двудневните яйчници медуларната зона се характеризираше с малко по-напреднал етап на овогенезата и фоликулогенезата, отколкото кортикалната зона. В едnodневните мишки в медуларната зона на яйчника зародишните гнезда вече се разпадаха, докато в кортекса те още можеха ясно да се наблюдават. В двудневните мишки по-добре оформени фоликули се откриваха в медуларната, отколкото в кортикалната зона на яйчника. Тази малка „преднина“ на медуларната част на яйчника по отношение на процесите на диференциране и клетъчните взаимодействия също отговаряше на литературните данни (Rajah et al., 1992; Pepling et al., 2010). Наблюдаваните разлики в степента на оформяне на примордиалните фоликули между отделните мишки бяха в рамките на очакваните индивидуални отклонения и не бяха значими. Следователно използваните от колектива опитни животни показваха типичния времеви ход на ранно развитие на яйчника и бяха подходящи за планираните изследвания.

### **6.3. Локализация и асиметрично разпределение на фибриларен актин и комплекс на Голджи в овоцити от новородени мишки**

При разработването на експериментален протокол за специфична локализация на микрофиламенти и комплекс на Голджи бяха избрани реактиви, които специфично да локализируют тези структури в състояние на изградена организация. Ето защо като „сонда“ за микрофиламентите беше използван белязан фалоидин, който реагира с F-актин, но не и с G-актин, а за апарата на

Голджи – периферният мембранен белтък GRASP65, отговорен за обединяването на цистерните в пачки.

Установената при настоящото изследване перинуклеарна пръстенна реакция за апарат на Голджи в овоцити от яйчници на новородени мишки отговаря по местоположение, размери и форма на телцето на Балбиани, описано от други автори на този етап от развитието на мишите овоцити (Pepling et al., 2007; Kloc et al., 2008). Регистрираната от нас асоциация на F-актина с телцето на Балбиани обаче по наши данни досега не е описвана в овоцити от бозайници, макар че е установена в овоцити от низши гръбначни – рибата данио (Escobar-Aguirre et al., 2017) и жабата *Xenopus* (Zelenka et al., 1992). Наблюдаваната в настоящото изследване колокализация на Голджи маркера GRASP65 и микрофиламенти навежда на предположение за участие на актина в натрупването на Голджи материал (а вероятно и на други компоненти) в телцето на Балбиани. Взаимното разположение на двете структури (актиновият пръстен обгражда кръгообразното Голджи струпване) се съгласува с модел, при който микрофиламентите поддържат структурата на телцето на Балбиани и / или го задържат в перинуклеарната област. Възможно е обаче и микрофиламентите да се натрупват около телцето, за да подготвят неговото предстоящо на по-късен етап разрушаване, каквато роля Escobar-Aguirre et al. (2017) установяват за микрофиламентите спрямо телцето на Балбиани в овоцити от риба.

Реакция за фибриларен актин бе установена също и в междуклетъчните мостове между овоцитите в еднедневния миши яйчник. Тази находка предполага роля на микрофиламентите в поддържане на мостчетата и подпомагане на транспортирането на органели между овоцитите. Доколкото ни е известно, такава функция на актиновите филаменти в зародишни гнезда от бозайници досега не е обсъждана. Изследвания на нашия екип са установили опорна роля на микрофиламентите в цитоплазмените израстъци, свързващи кумулусните клетки през *zona pellucida* със зреещия миши овоцит (Markova et al., 2015). В това отношение интерес представлява фактът, че при овогенезата на *Drosophila* зародишните гнезда, включващи овоцит и изхранващи клетки, се характеризират

с пръстеновидни канали между овоцита и изхранващите клетки от същото гнездо, като структурата на тези канали се поддържа както от микротубули, така и от микрофиламенти. Двата вида цитоскелетни нишки с помощта на моторни белтъци и разход на енергия транспортират от изхранващите клетки към овоцита различни компоненти, включително мембрани на апарата на Голджи (Nicolas et al., 2009). Получените при настоящото изследване резултати показват участие на актина в поддържане на междуклетъчните мостове между овоцитите при бозайник – мишка. Локализацията на микрофиламенти и Голджи материал в мостовете показва, че е твърде вероятно везикулният транспорт на органели между клетките от едно зародишно гнездо да следва еволюционно консервативен модел, свързващ относително далечнородствени, отдавна дивергирани групи животни с ранната овогенеза при бозайници. Този модел изглежда още по-вероятен след съобщението на Lei and Spradling (2016), че в развиващите се яйчници от бозайници част от клетките в зародишните гнезда играят ролята на изхранващи клетки и загиват, след като през междуклетъчните мостове прехвърлят част от органелите си към овоцитите, избрани да оцелеят. При настоящото изследване в двудневния миши яйчник междуклетъчни мостове вече почти не се наблюдаваха, което показва, че този процес вече е почти завършен, зародишните гнезда се разпадат и оцелелите овоцити се включват във фоликулогенеза. Наблюдаваната положителна реакция за фибриларен актин в местата на контакт между гранулозните клетки следва да се тълкува като показател, че тези клетки вече се обединяват в типичен епителен слой и установяват тясна механична връзка и комуникация помежду си.

Описаният модел на разпределение на Голджи материал и актин в овоцити от новородени мишки съответства на наблюдаваната пръстеновидна структура от цитокератини и виментин в човешки примордиални фоликули при поликистоза. Пръстеновидно разположение на комплекс на Голджи е описвано в научната литература като асоцииране на Голджи с телцето на Балбиани (Perling et al., 2007). Нашето изследване допълва данните за структурите на телцето, като предоставя данни за наличие на Голджи агрегат с перинуклеарно разположение, наблюдаван на някои срези в пръстенна форма, който е обграден от

микрофиламенти в ранните профазни овоцити в яйчници на новородени мишлета. Присъствието на актин говори за евентуална негова роля в организирането и стабилизирането на телцето на Балбиани, макар че е възможно на по-късен етап при овоцитното зреене същите микрофиламенти да участват в разграждането на тази преходна структура.

Настоящата работа изяснява ролята на микрофиламентите като цитоскелетни компоненти по време на ранната овогенеза при бозайници – участие на фибриларен актин в стабилизацията както на телцето на Балбиани, така и на междуклетъчните мостове. Присъствието на комплекс на Голджи и микрофиламенти в тези области подкрепя схващане за запазване на древен, еволюционно консервативен модел за овоцитна асиметрия и транспорт на органели по време на ранната овогенеза при бозайници.

#### **6.4. Локализация и динамика на PCM-1 и митохондриален маркер в овариални срези от новородени мишки**

Благодарение на времевия ход на овоцитната мейоза при мишка, при който dictyate настъпва след раждането, яйчниците от новородени мишлета са подходящ обект за проследяване на динамиката на избрани компоненти на центрозомата в края на профазата I, когато настъпва нейното разпадане. В досега публикуваните изследвания основното внимание се насочва към гама-тубулина като най-важен компонент на МТОС. Следва обаче да се проследи и реорганизацията на останалите съставни белтъци на центрозомата, доколкото те се преразпределят в клетката по различен начин и могат да поемат допълнителни функции (Manandhar et al., 2005). За настоящото изследване беше избран центриолният сателитен белтък PCM-1 поради функцията му да осигурява радиално разположение на микротубулите и да насочва към центрозомата други нейни компоненти като центрин и перицентрин (Dammernann and Merdes, 2002). В ранни профазни овоцити от фетален миши яйчник PCM-1 е локализиран в обичайната си позиция около центриолите, без да се уточнява броят и общият

вид на неговите струпвания (Kloc et al., 2008). Доколкото ни е известно обаче, настоящото изследване е първото, което проследява промените във вътреклетъчното разпределение на този белтък на малко по-късен етап, при прехода на овоците към dictyate.

Заслужава внимание фактът, че в срезите от едnodневни яйчници белегът за РСМ-1 беше концентриран в единичен или двоен агрегат, разположен близо до ядрото. Когато агрегатът беше единичен, той често беше широк или изглеждаше „двуделен“, което може да се види на Фигура 14А. Това предполага, че агрегатите са два във всички овоцити на този стадий, но в някои клетки поради пространствено сближаване изглеждат обединени. Предполагаме, че те съответстват на удвоената центрозома, чиито две копия могат да останат плътно сближени или да се раздалечат на известно разстояние. Центрозомите на ранните профазни овоцити преди стадий dictyate играят роля в организацията на телцето на Балбиани и винаги са асоциирани с него (Kloc et al., 2008). От друга страна, при мишка ранният постнатален период отговаря на прехода към dictyate, когато центрозомите се разпадат и гама-тубулинът, преминал в неактивно състояние, се съсредоточава в двойка мултивезикулни агрегати (Calarco, 2000; Manandhar et al., 2005). Следователно трябва да се има предвид и възможността двата центъра на положителна реакция за РСМ-1 да съответстват на мултивезикулните агрегати, които от своя страна най-вероятно са получени от двете центрозоми. Наличието на видимо единичен или двоен агрегат и разстоянието между двете струпвания РСМ-1 положителен материал в клетките с двоен агрегат не корелираше с други видими характеристики на овоците. Това позволява да се предположи, че става дума за чисто индивидуални разлики между отделните овоцити на този етап от диференцирането им.

Интересен резултат беше видимото съответствие между единичния или двоен агрегат, реагиращ положително за РСМ-1, и основното струпване на кондензиран хроматин в ядрото на ранните профазни овоцити. Възниква въпросът как е възможно цитоплазмени структури като съдържащите РСМ-1 центриолни сателити да се асоциират с кондензирания хроматин, намиращ се в

ядрото. Взаимодействието на микротубулния цитоскелет с хромозомите през интактна ядрена обвивка по принцип е напълно възможно – то е основата на най-древния тип затворена митоза, възникнала рано в еволюцията и наблюдавана и днес при много едноклетъчни еукариоти (Alberts et al., 2008). За животински клетки такава взаимодействие не е обичайно, но по данни на Shibuya et al. (2014) се наблюдава при миши сперматоцити в профаза I, а Elkouby et al. (2016) го установяват при овоцити от *Danio*. Логично е да се допусне, че същото явление е свойствено и на незрелите овоцити в профаза I в неонаталния миши яйчник. Взаимодействието би могло да се осъществи през самата ядрена обвивка (с посредничеството на мембранни белтъци) или през ядрените пори.

Успоредно с центриолния сателитен белтък PCM-1 беше локализиран митохондриалният белтък VDAC-1, което позволи да се проследи връзката между центриолните сателити и телцето на Балбиани, в което са струпани митохондрии. Реакцията за митохондриалния маркер беше положителна в съседство с агрегата, съдържащ PCM-1. Това следва да се тълкува като потвърдителен резултат за ролята на центрозомата на ранните овоцити при организацията на телцето на Балбиани, чийто важен компонент са митохондриите. Агрегатът, положителен за PCM-1, беше разположен между ядрото и митохондриалния агрегат (телцето на Балбиани). Това наблюдение добре се съгласува с публикуваните съобщения на други автори (Петков, 1988; Elkouby et al., 2016). Следва да се отбележи, че митохондриалното струпване, макар и видимо асоциирано с реакцията за PCM-1, не съвпаднаше с нея напълно и имаше различна форма. То рядко беше раздвоено дори в клетките, в които PCM-1 образуваше два ясно разграничени агрегата. Разликата навежда на предположението, че още на този ранен етап телцето на Балбиани се опира и на други организиращи структури освен центрозомата.

В двудневните миши яйчници находката беше твърде различна от тази в едnodневните въпреки сравнително малката разлика във времето (24 часа). Успоредно с хомогенния вид на хроматина, показващ преход към dictyate, реакцията за PCM-1 се беше разпространила на по-голяма площ и се разстиляше

сърповидно от едната страна на ядрото. Следва да се предполага, че триизмерната ѝ форма наподобява шапка. При много от овоцитите реакцията за РСМ-1 вече беше загубила своята дискретност до такава степен, че беше невъзможно да се прецени дали преди това е била съсредоточена в един или два агрегата. От това наблюдение може да се заключи, че на този етап вече няма структури, които като центрозоми да привличат и задържат центриолните сателити. Нужни са по-подробни изследвания, за да се определи дали наблюдаваното разпръскване на РСМ-1 има аналог в намалената имунореактивност за този белтък в късната G2 и M-фазата на митотичния клетъчен цикъл или е резултат от разпадането на центрозомата, което е характерно само за овоцитната мейоза.

Разпределението на митохондриалния маркер VDAC-1 в овоцитите от двудневни мишки също беше по-дифузно от това в пробите от едnodневни мишки. При това се наблюдаваха ясни разлики между отделните овоцити – в повечето клетки реакцията още се очертаваше перинуклеарно струпване малко по-компактно от това на РСМ-1, докато в други оцветяването беше по-хомогенно и обхващаше цитоплазмата като цяло. Най-вероятното обяснение за тези разлики е, че в двудневния яйчник овоцитите със запазен перинуклеарен митохондриален агрегат (т.е. телце на Балбиани) съставят репродуктивния резерв на животното, докато овоцитите с дифузна реакция за митохондриалния маркер, показваща разпадане на телцето на Балбиани, са започнали да растат и ще се включат в първата вълна на овоцитно зреене. Както беше посочено по-горе, телцето на Балбиани се разпада при активирането на овоцита за растеж (Albamonte et al., 2013).

Тясната асоциация с центриолния сателитен маркер РСМ-1, характерна за овоцитите от едnodневния яйчник, в срезите от двудневни яйчници вече не се наблюдаваше. Тези находки се съгласуват с описаното в литературата разпадане на центрозомата след пахитена (Manandhar et al., 2005). Поради загубата на центрозомата след прехода към dictyate микротубулният апарат на овоцита вече не може да изпълнява ролята си на организатор на телцето на Балбиани. Засега

няма преки данни кой клетъчен компонент поема тази функция в овоцитите от бозайници. Ако се съди от данните за риби и земноводни, може да се очаква това да бъде белтък, хомоложен на амилоидните белтъци Bucky ball и xvelo и склонен да образува агрегати. Не трябва обаче да се изключва и възможността роля в това отношение да играят цитоскелетни компоненти, различни от микротубулите.

#### **6.5. Сравнение на локализацията на РСМ-1 и интермедиерни филаменти в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки**

Интермедиерните филаменти са цитоскелетна система, отличаваща се с висока стабилност и механична устойчивост. Кератинови и виментинови IF се съдържат в овоцитната цитоплазма както по литературни данни, така и според собствени по-ранни изследвания. Колокализация на цитокератини с телцето на Балбиани е установена в ранни профазни овоцити от риба (Escobar-Aguirre et al., 2017) и птица (Rodler and Sinowatz, 2013). Авторите на последния труд отчитат положителна реакция и за виментин в незрелите птичи овоцити. При човек Santini et al. (1993) наблюдават в овоцити от фетален и възрастен човешки яйчник единичен перинуклеарен цитокератинов агрегат, вероятно отговарящ на телцето на Балбиани. Като цяло обаче литературните данни за интермедиерни филаменти в овоцити на всички етапи от овогенезата са недостатъчни и противоречиви. Предишни изследвания на нашия колектив са установили наличие и колокализация на цитокератини и виментин в зреещи миши овоцити (Markova et al., 2015; Nikolova et al., 2016). При тези опити не е наблюдавано телце на Балбиани, защото на този етап от овогенезата то вече е претърпяло разпад и компонентите му са се разпръснали. В обсъдените по-горе примордиални фоликули от човешки поликистозни яйчници имуноцитохимичната локализация на цитокератини и виментин даде положителен резултат и очерта в цитоплазмата структура с перинуклеарно разположение, която оценихме като идентична с телцето на Балбиани.

За да характеризираме по-пълно евентуалното участие на тези белтъци на IF в телцето на Балбиани, предприехме имунохистохимично изследване за тях в срези от яйчници на новородени мишки. Успоредно проведохме реакция за белтъка РСМ-1, за да сравним организацията на IF с тази на центриолните сателити по времето, когато овоцитната центрозома е в процес на дегенерация. И двата типа белтъци на IF – цитокератини и виментин, бяха локализирани в единичен агрегат, разположен близо до ядрото и до РСМ-1 агрегатите. Наблюдаваше се асоциация, но не и пълна колокализация между IF и РСМ-1. Реакцията за цитокератини и виментин, сравнена с тази за РСМ-1, показваше склонност към обединяване, като в повечето овоцити от едnodневни мишки и всички наблюдавани овоцити от двудневни мишки беше съсредоточена в единичен агрегат. Срезите от двудневни яйчници, сравнени с тези от едnodневните, показаха изразена разлика в находката: реакцията за цитокератини и виментин обхващаше по-широка площ покрай ядрото, а асоциацията ѝ с центриолния сателитен белтък РСМ-1 беше отслабена. Тази микроскопска картина показва, че при прехода към dictyate цитоплазмените интермедиерни филаменти губят връзка с центрозомените компоненти, но запазват връзката си с ядрото, изразена в перинуклеарното им разположение. Грануларната консистенция на имуноцитохимичната реакция за IF и очертаната от нея форма на прилежаща към ядрото дъга или кръг в зависимост от ъгъла на наблюдение отговаря на находката в овоцити от примордиални фоликули в човешки поликистозни яйчници. Може да се предположи, че в овоцитите, намиращи се в покой в dictyate, цитокератините и виментинът запазват това разположение от феталния или неонатален период до евентуалното активиране на овоцита за зреене в конкретен естрален/менструален цикъл. Белтъците на IF, по-конкретно цитокератините, по данни на различни автори присъстват в овоцити от различни класове гръбначни и показват сходна реорганизация в хода на овогенезата, но функцията им засега е неизвестна (Nikolova et al., 2016). Данните от настоящото изследване разкриват асоциация на цитокератините и виментина с телцето на Балбиани при незрели овоцити от два различни вида бозайници (човек и мишка). Това навежда на предположението, че е възможно

интермедиерните филаменти да допринасят за стабилността на телцето на Балбиани след пахитена, когато центрозомата се разпада.

Установената положителна реакция за двата типа белтъци на IF в гранулозните клетки и особено в местата на контакт между тях се съгласува с литературни данни (Santini et al., 1993) и предишни собствени изследвания (Markova et al., 2015) и също като реакцията за актин вероятно отразява все по-тясното взаимодействие между тези клетки при обединяването им около овоцита за образуване на фоликул.

#### **6.6. Експресия на маркер за зародишна герминативна линия в срезите от яйчници на едnodневни и двудневни мишки**

Белтъкът DDX4 е еволюционно консервативен маркер за герминативна клетъчна линия, т.е. експресира се изключително в клетките от половия път и липсва в соматичните клетки (Stoop et al., 2005; Song et al., 2016). Има РНК-хеликазна активност и според наличните данни потиска транскрипцията на подвижните генетични елементи (транспозоните), с което предотвратява „размножаването“ на ретротранспозоните в герминативните клетки и поддържа стабилността на генома (Hadziselimovic et al., 2011). В овоцитите от насекоми, риби и земноводни неговият хомолог Vasa се натрупва в телцето на Балбиани (Marlow, 2010). Според някои автори в ранните профазни овоцити от бозайници DDX4 също се съсредоточава в телцето на Балбиани (Albamonte et al., 2013), но други изследователи го откриват дифузно в цялата цитоплазма (Pepling et al., 2007). Ние проведохме имунохистохимично изследване с антитяло срещу DDX4, за да проверим дали този белтък показва предпочитание към телцето на Балбиани в срезите от неонатален миши яйчник.

Получените резултати показаха наличие на DDX4 в герминативните клетки (овоцитите), както се очакваше според данните за тъканно-специфичната експресия на този белтък. В ранните профазни овоцити от едnodневния яйчник се наблюдаваше ярко светещ единичен агрегат в перинуклеарна позиция, докато

останалата част на цитоплазмата показва слабо положителна реакция. По вид и разположение този агрегат изглеждаше идентичен с телцето на Балбиани. В двудневния яйчник овоцитите, вече намиращи се в dictyate, се характеризираха с дифузна реакция за DDX4. С други думи, DDX4 се разпределяше в овоплазмата равномерно при прехода към dictyate, но това беше предхождано от съсредоточаване в телцето на Балбиани на по-ранните стадии от мейотичната профаза I. Следователно нашите резултати, получени за новородена мишка, се различават от тези на Repling et al. (2007) за същия обект (дифузна реакция на всички стадии) и са сходни с получените от Albamonte et al. (2013) за човешки яйчници. Въз основа на това следва да се приеме, че при плацентните бозайници също като при останалите изучени животни РНК-хеликазата DDX4 преходно се концентрира в телцето на Балбиани. Резултатът е интересен, защото локализацията на РНК-хеликазата в телцето е свързана с наличието в него на мРНК, каквито засега не са доказани в овоцити на плацентни бозайници. Може да се предположи, че при по-нататъшни изследвания такива запасени мРНК ще бъдат открити, макар и далеч по-малко като набор и количество, отколкото при животните с телолецитални яйца и изразено мозаично развитие.

#### **6.7. Локализация и динамика в разпределението на РСМ-1 по време на мейотичното зреене на миши овоцити**

След като изследвахме вътреклетъчното разпределение на редица компоненти на овоцита в срези от миши неонатален яйчник, локализирахме един от тях – РСМ-1, в зреещи овоцити от постпубертетен яйчник. Този белтък беше избран, тъй като участва в изграждането на центриолните сателити и така позволява да се проследят тези малко изучени съставки на центрозомата. Доколкото асиметричното разпределение на органели в овоцита се създава с участието на микротубулите и телцето на Балбиани е асоциирано с центрозомата, нужно е да се разкрие динамиката на компонентите на центрозомата в зреещи овоцити, за да се разбере как те губят своята изходна полярност.

Сравнително дифузната перинуклеарна реакция за РСМ-1 в овоцитите, непосредствено възобновили своята мейоза, е очаквана находка. След като овоцитните центрозоми се разпаднат при прехода към dictyate, техните компоненти се разпръсват в цитоплазмата. Впоследствие при възобновяването на мейозата около ядрото, чиято обвивка все повече се дестабилизира, се формират множество малки МТОС (установени чрез положителната им реакция за гама-тубулин), които ще изградят делително вретено, без обаче да се обособяват в центрозома (Manandhar et al., 2005; Делимитрева, 2010). Следва да се очаква компонентите на МТОС да се организират около ядрото постепенно, като част от тях дълго време остават в дифузен вид в цитозола. Ето защо наблюдаваната на стадий GV имуноцитохимична локализация на РСМ-1 е логична и показва, че е много вероятно на този ранен етап от овоцитното зреење центриолните сателити да се асоциират с гама-тубулина въпреки липсата на обособени центрозоми.

Асоциацията на РСМ-1 с кондензирания хроматин показва взаимодействие между тях още преди разпадането на ядрената обвивка. Възможността за такова взаимодействие между ядрени и цитоплазмени компоненти беше обсъдена в предишен подраздел, посветен на динамиката на РСМ-1 в яйчници от новородени мишки. В зреещия овоцит такова взаимодействие може да се осъществи още по-лесно поради промените, настъпващи в ядрената обвивка. В края на GV-стадия тя е все още съхранена като видима микроскопска структура, но става силно пропусклива поради поява в нея на широки отвори, надхвърлящи 10-20 пъти диаметъра на ядрените пори (Choi et al., 1996). По данни на нашия екип на този етап в ядрото могат да се открият цитоплазмени белтъци, което означава, че ядрената обвивка е престанала да бъде препятствие за макромолекулите и ги пропуска свободно (Nikolova et al., 2017). Тези съображения позволяват да се предположи взаимодействие на центриолния сателитен белтък РСМ-1 с кондензиращите се профазни хромозоми през широките отвори, предшестващи разпадането на ядрената обвивка.

Неочакван аспект на локализацията на белтъка PCM-1 на стадиите късен GV и разпадане на GV обаче е присъствието му не в един, а в два участъка от двете страни на кондензирания хроматин. Съсредоточаването на този белтък – компонент на центриолните сателити в две струпвания, които заграждат набора профазни хромозоми, навежда на предположението, че по този начин се подготвя изграждането на двуполусно вретено. При митозата на соматичните клетки и мейозата на сперматоцитите двуполусното вретено се организира естествено чрез разделяне на двете центрозоми, получени чрез предварително удвояване на изходната (майчина) центрозома и служещи като полюси на вретеното. При овоцитната мейоза сглобяването на двуполусно вретено е проблематично поради липсата на центрозоми. Нуклеацията на микротубули се активира в близост до хромозомния набор и особено до централната ДНК, а събирането им в два полюса се постига чрез набор от белтъци, асоциирани с микротубулите (Manandhar et al., 2005; Schuh and Ellenberg, 2007). Данните от настоящото изследване сочат, че процесът на обособяване на два полюса вероятно започва още преди разпадането на GV и в него освен гама-тубулин участва и PCM-1, а вероятно и други компоненти на центрозомата.

В метафазните овоцити, наблюдавани през настоящото изследване, PCM-1 се локализира по дължината на вретеновите нишки и по този начин се разпределя от полюсите на вретеното до екваториалната му част. Може да се предположи, че центриолните сателити взаимодействат с микротубулите по цялата им дължина, а не само с фиксирания в полюсите им край. Освен това явно взаимодействието с хромозомите, започнало още в края на стадий GV, се запазва или възобновява и с напредването на фазите на деленето взема превес, както показва асоциацията на центриолния сателитен белтък с хроматина в телофазния овоцит на Фигура 27. Този резултат, според който PCM-1 остава компактен и се асоциира с микротубулите и хромозомите по време на мейозата, следва да се съпостави с литературните данни за неговото разпръскване и видимо изчезване по време на митозата (Kubo and Tsukita, 2003; Lopes et al., 2011). Едно възможно обяснение е, че в делящите се соматични клетки по време на митозата, когато експресията на гена за PCM-1 спира, запасите му в цитоплазмата се

изчерпват, докато в овоцита поради големия му обем се запазва достатъчно количество от белтъка, за да бъде регистрирано. Освен това може да се предположи, че разпръсването на гранулите РСМ-1 около полюсите, съобщено от Värenz et al. (2013), отразява тяхно движение по микротубулите до хромозомите.

Един аспект на резултатите за РСМ-1, който засега е трудно да се обясни, е неговата локализация успоредно на вретеновите нишки откъм кортикалната им страна в част от метафазните овоцити. Следва да се отбележи, че Zimmerman and Doxsey (2000), изследвайки поведението на РСМ-1 съдържащи частици, на фона на преобладаващото им движение към центрозоите наблюдават в някои случаи движение към клетъчната периферия, чийто механизъм остава неясен. Може да се допусне, че белтъкът РСМ-1 е способен при определени условия да се разполага субплазмалемно, като се асоциира с актин или друг компонент на клетъчния кортекс. По време на овоцитната мейоза това вероятно подпомага „закотвянето” на вретено под клетъчната мембрана, а в други типове клетки би могло да допринася за периферната локализация на базалните телца на ресничките и камшичетата.

Асоциацията на РСМ-1 с мейотичното вретено и компактните хромозоми на зреещите овоцити води до асиметрична локализация на този белтък след изтеглянето на вретено в периферията (късна метафаза I и последващите стадии). Не бяха установени обаче взаимодействия с други клетъчни компоненти. С други думи, в зреещия овоцит РСМ-1 видимо не е ангажиран с организация на асиметрични субклетъчни структури освен самото мейотично вретено. След разпадането на центрозомата нейните компоненти вече не са натоварени да осигуряват полярност на цялото клетъчно съдържимо на овоцита. Телцето на Балбиани е изиграло ролята си и няма да се възстанови. Полярността на овоцитите от бозайници е преходна. Тя е свойствена на ранните профазни овоцити от развиващия се яйчник и на спрените в dictyate овоцити от овариалния резерв, но когато те навлязат във фазата на мейотично зреене и се подготвят да участват в оплождане, единствената им видима асиметрия остава периферното

разположение на мейотичното вретено, което трябва да осигури малки размери на полярните телца.

Заклучението от експериментите, включени в настоящото изследване, е, че овоцитите от плацентни бозайници в ранна профаза I, намиращи се в зародишните гнезда на развиващия се яйчник, както и спрените в стадий dictyate овоцити в примордиалните фоликули на развиващия се и възрастния яйчник, се отличават с асиметрия и полярност. Тя се изразява в наличието на перинуклеарен комплекс от мембранни органели и цитоскелетни елементи – телце на Балбиани. Първоначалната му форма е сравнително компактна, но с прехода към dictyate то се разширява и се прилепя към едната страна на ядрото като шапка. В зародишните гнезда телцето се разполага в близост с цитоплазмените мостове между герминативните клетки и натрупва органели, пренасяни по мостовете към овоцитите, които ще избягнат апоптозата. В този транспорт на органели вероятно участват микрофиламенти. Телцето на Балбиани се организира с помощта на центрозома, но се запазва много по-дълго от нея, вероятно използвайки за опора асоциирани с него микрофиламенти и интермедиерни филаменти от цитокератини и виментин. В ранните профазни овоцити телцето на Балбиани съдържа хеликазата DDX4, което е довод в полза на хипотезата, че при плацентните бозайници подобно на другите изучени групи животни този преходен комплекс от органели натрупва мРНК с важно значение за бъдещия зародиш. В овоцитите от примордиалните фоликули на човешките поликистозни яйчници телцето на Балбиани присъства, но има донякъде атипичен вид – при наблюдение се различават отделни съставни гранули. Еволюционната консервативност на структурата и динамиката на телцето на Балбиани и фактът, че то се променя при патологични промени (поликистоза) на яйчника, показват, че полярността на овоцитите от плацентни бозайници най-вероятно не е еволюционен реликт без значение за клетката, а необходимо условие за нормалното функциониране и потенциала за развитие на овоцита.

## 7. Изводи и приноси

### Изводи:

1. Наблюдаваната грануларна структура с правилна форма в овоцити от примордиални фоликули на овариални срези при поликистоза на яйчника съответства на телце на Балбиани.
2. Необичайната организация на телцето на Балбиани би могла да се окаже характерна за примордиалните фоликули при овариалната поликистоза.
3. Присъствието на фибриларен актин, асоцииран с телцето на Балбиани, предполага евентуална роля на микрофиламентите в организирането, стабилизирането на телцето и / или неговото задържане в перинуклеарната област на мишите овоцити.
4. Реакцията за фибриларен актин в междуклетъчните мостове предполага роля на микрофиламентите в тяхното поддържане и вероятно в органелния транспорт между мишите овоцити, което отговаря на еволюционно консервативен модел на ранната овогенеза.
5. Динамиката на центриолния сателитен белтък РСМ-1 през профаза I е свързана първо с обособяване на дискретен единичен или двоен перинуклеарен агрегат, асоцииран с кондензиран хроматин и митохондриалния облак на телцето на Балбиани, последвано от разстилането му в прилежаща към ядрото полулунна структура.
6. Цитокератинови и виментинови интермедиерни филаменти се асоциират с телцето на Балбиани и вероятно допринасят за механичната му устойчивост.
7. Маркерът за герминативни клетки DDX4 през ранната профаза I колокализира с телцето на Балбиани, преди да се локализира дифузно в цитоплазмата през dictyate, което предполага запазване при бозайници на функцията на телцето да натрупва и регулира мРНК.
8. При възобновяване на мейозата при овоцитното зреене РСМ-1 се асоциира с хромозомите и мейотичното вретено откъм периферната му повърхност, съответстващо на асиметричната локализация на вретеното след метафаза I.

### **Приноси:**

1. Установено е наличие и атипична структура на телце на Балбиани в примордиални фоликули от човешки яйчници с поликистоза, което е довод в подкрепа на възможното му функционално значение.
2. Установено е участие на микрофиламенти в структурата и динамиката на телце на Балбиани в ранни овоцити от бозайник.
3. Проследена е динамиката на центриолния сателитен белтък РСМ-1 в ранни и зреещи миши овоцити.
4. Установена е асоциация на цитокератинови и виментинови интермедиерни филаменти с телце на Балбиани в овоцити от мишка и човек.
5. Установено е наличие на герминативния маркер DDX4, показващ роля в метаболизма на РНК, в телце на Балбиани в ранни профазни овоцити от бозайник.

Приносите на дисертационния труд са с научно-теоретичен характер. Приноси 1, 2 и 3 са изцяло оригинални, а приноси 4 и 5 са отчасти с потвърдителен характер предвид противоречивите литературни данни.

## 8. Библиография

### *Литературни източници на кирилица:*

1. Делимитрева С. Мейотично зреене на овоцитите – взаимодействие на хроматина и цитоскелетните елементи. *Акуш. гинекол.* 2010; 49 (5): 51-58.
2. Живкова Р, Пъневска М, Делимитрева С, Рукова Б, Тончева Д, Ватев И. Анализ на единични човешки яйцеклетки и фоликули, изолирани от оперативно отстранена яйчникова тъкан при пациентки с овариална поликистоза. *Акуш. Гинекол.* 2009; 48 (3): 19-26.
3. Лазаров ВВ, Трифонова НЛ, Димитрова-Диканарова ДК. Антитела срещу имунологично изолирани антигени при пациентки със синдром на поликистозните яйчници (PCOS). *Акуш. гинекол.* 2016; 55 (6): 35-39.
4. Маркова М, Делимитрева С, Живкова Р, Николова В, Димитрова Д. Цитоплазмени интермедиерни филаменти в гамети от бозайници (обзор). *Андрология.* 2010. 19 (3): 17-20.
5. Овчаров В, Такева Ц. *Цитология, обща хистология, обща ембриология.* 6-то изд. София: Арсо; 2009.
6. Петков П. (ред.). *Атлас по хистология.* София: Медицина и физкултура. 1988: 185-187.
7. Пъневска М, Филипов Е, Майнхард К, Живкова Р. Лапароскопска фенестрация и биопсия на яйчниците при жени с поликистозна болест и инфертилитет. *Акуш. Гинекол.* 2011; 50 (1): 21-24.
8. Чучков ХН. *Медицинска ембриология.* Стара Загора: Издателство „Тракийски университет“; 2001.

### *Литературни източници на латиница (източниците с участие на български автори са означени със звездичка):*

9. Adhikari D, Liu K: Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 2009; 30 (5): 438–464.
10. Albamonte MI, Albamonte MS, Stella I, Zuccardi L, Vitullo AD. The infant and pubertal human ovary: Balbiani's body-associated VASA expression, immunohistochemical detection of apoptosis-related BCL2 and BAX proteins, and DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2013; 28 (3): 698–706.
11. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Chapter 16: The cytoskeleton. In: *Molecular biology of the cell.* 5th edition. New York: Garland Science; 2008.
12. Appert A, Fridmacher V, Locquet O, Magre S. Patterns of keratins 8, 18 and 19 during gonadal differentiation in the mouse: sex- and time-dependent expression of keratin 19. *Differentiation.* 1998; 63 (5): 273-284.

13. Ayala I, Colanzi A. Assays to Study the Fragmentation of the Golgi Complex During the G2-M Transition of the Cell Cycle. *Methods Mol Biol.* 2016; 1496: 173-185.
14. Azoury J, Verlhac MH, Dumont J. Actin filaments: key players in the control of asymmetric divisions in mouse oocytes. *Biol Cell.* 2009; 101 (2): 69-76.
15. Azoury J, Lee KW, Georget V, Hikal P, Verlhac MH. Symmetry breaking in mouse oocytes requires transient F-actin meshwork destabilization. *Development.* 2011; 138 (14): 2903-2908.
16. Baba T, Endo T, Honnma H, Kitajima Y, Hayashi T, Ikeda H, Masumori N, Kamiya H, Moriwaka O, Saito T. Association between polycystic ovary syndrome and female-to-male transsexuality. *Hum Reprod.* 2007; 22 (4): 1011-1016.
17. Bakhshalizadeh S, Amidi F, Alleyassin A, Soleimani M, Shirazi R, Shabani Nashtaei M. Modulation of steroidogenesis by vitamin D3 in granulosa cells of the mouse model of polycystic ovarian syndrome. *Syst Biol Reprod Med.* 2017; 63 (3): 150–161.
18. Balczon R, Bao L, Zimmer WE, Brown K, Zinkowski RP, Brinkley BR. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol.* 1995; 130 (1): 105-115.
19. Balczon R, Simerly C, Takahashi D, Schatten G. Arrest of cell cycle progression during first interphase in murine zygotes microinjected with anti-PCM-1 antibodies. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2002; 52 (3): 183-192.
20. Balen AH, Schachter ME, Montgomery D, Reid RW, Jacobs HS. Polycystic ovaries are a common finding in untreated female to male transsexuals. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993; 38 (3): 325-329.
21. Bärenz F, Inoue D, Yokoyama H, Tegha-Dunghu J, Freiss S, Draeger S, Mayilo D, Cado I, Merker S, Klinger M, Hoeckendorf B, Pilz S, Hupfeld K, Steinbeisser H, Lorenz H, Ruppert T, Wittbrodt J, Gruss OJ. The centriolar satellite protein SSX2IP promotes centrosome maturation. *J Cell Biol.* 2013; 202 (1): 81-95.
22. Bekier ME 2nd, Wang L, Li J, Huang H, Tang D, Zhang X, Wang Y. Knockout of the Golgi stacking proteins GRASP55 and GRASP65 impairs Golgi structure and function. *Mol Biol Cell.* 2017; 28 (21): 2833-2842.
23. Ben-Shlomo I, Younis JS. Basic research in PCOS: are we reaching new frontiers? *Reprod Biomed Online.* 2014; 28 (6): 669–683.
24. Bhide P, Homburg R. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016; 37: 38–45.
25. Billett FS, Adam E. The structure of the mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *J Embryol Exp Morphol.* 1976; 36 (3): 697–710.
26. Boke E, Ruer M, Wühr M, Coughlin M, Lemaitre R, Gygi SP, Alberti S, Drechsel D, Hyman AA, Mitchison TJ. Amyloid-like Self-Assembly of a Cellular Compartment. *Cell.* 2016; 166 (3): 637-650.

27. Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova. *Exp Cell Res.* 1967; 45 (1): 39–47.
28. Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development.* 2007; 134 (19): 3401–3411.
29. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* 2006; 312 (5773): 596–600.
30. Boyle J, Teede HJ. Polycystic ovary syndrome – an update. *Aust Fam Physician.* 2012; 41 (10): 752–756.
31. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE, Woodruff TK. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Dev Biol.* 2006; 298 (1): 132–148.
32. Brunet S, Verlhac MH. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum Reprod Update.* 2011; 17 (1): 68-75.
33. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 20.
34. Bukovsky A, Gupta SK, Virant-Klun I, Upadhyaya NB, Copas P, Van Meter SE, Svetlikova M, Ayala ME, Dominguez R. Study origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human and rat ovaries. *Methods Mol Biol.* 2008; 450: 233-265.
35. Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev.* 1986; 66 (1): 71–117.
36. Byskov AG, Guoliang X, Andersen CY. The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an in-vitro study of the mouse ovary. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3 (9): 795–800.
37. Caanen MR, Schouten NE, Kuijper EAM, van Rijswijk J, van den Berg MH, van Dulmen-den Broeder E, Overbeek A, van Leeuwen FE, van Trotsenburg M, Lambalk CB. Effects of long-term exogenous testosterone administration on ovarian morphology, determined by transvaginal (3D) ultrasound in female-to-male transsexuals. *Hum Reprod.* 2017; 32 (7): 1457-1464.
38. Calarco PG. Polarization of mitochondria in the unfertilised mouse oocytes. *Dev Genet.* 1995; 16 (1): 36–43.
39. Calarco PG. Centrosome precursors in the acentriolar mouse oocyte. *Microsc Res Tech.* 2000; 49 (5): 428-434.
40. Chamcheu JC, Siddiqui IA, Syed DN, Adhami VM, Liovic M, Mukhtar H. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 508 (2): 123-137.
41. Chao JT, Niwa M. Nursing the Follicles. *Dev Cell.* 2016; 37 (1): 7-8.

42. Chen L, Ge ZJ, Wang ZB, Sun T, Ouyang YC, Sun QY, Sun YP. TGN38 is required for the metaphase I/anaphase I transition and asymmetric cell division during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle*. 2014; 13 (17): 2723-2732.
43. Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2007; 148 (8): 3580–3590.
44. \*Chipev CC, Yang JM, DiGiovanna JJ, Steinert PM, Marekov L, Compton JG, Bale SJ. Preverential sites in keratin 10 that are mutated in epidermolytic hyperkeratosis. *Am J Hum Genet*. 1994; 54 (2): 179-190.
45. Choi T, Rulong S, Resau J, Fukasawa K, Matten W, Kuriyama R, Mansour S, Ahn N, Vande Woude GF. Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93 (10): 4730-4735.
46. Clarke EJ, Allan VJ. Cytokeratin intermediate filament organisation and dynamics in the vegetal cortex of living *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2003; 56 (1): 13-26.
47. Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*. 1994; 79 (4): 679-694.
48. Cox RT, Spradling AC. A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis. *Development*. 2003; 130 (8): 1579–1590.
49. Cummins JM, Wakayama T, Yanagimachi R. Fate of microinjected sperm components in the mouse oocyte and embryo. *Zygote*. 1997; 5 (4): 301-308.
50. Dacks JB, Peden AA, Field MC. Evolution of specificity in the eukaryotic endomembrane system. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41 (2): 330–340.
51. Dammermann A, Merdes A. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol*. 2002; 159 (2): 255-266.
52. De Felici M, Dolci S, Siracusa G. Fetal germ cells establish cell coupling with follicle cells in vitro. *Cell Differ Dev*. 1989; 28 (1): 65–69.
53. \*Delimitreva S, Tkachenko OY, Berenson A, Nayudu PL. Variations of chromatin, tubulin and actin structures in primate oocytes arrested during in vitro maturation and fertilization--what is this telling us about the relationships between cytoskeletal and chromatin meiotic defects? *Theriogenology*. 2012; 77 (7): 1297-1311.
54. De los Reyes M, Palomino J, Jofré S, Villarroel A, Moreno R. Golgi apparatus and endoplasmic reticulum dynamic during meiotic development in canine oocytes. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47 (Suppl 6): 93-97.
55. De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod*. 1997; 12 (10): 2235-2241.

56. de Smedt V, Szöllösi D, Kloc M. The Balbiani body: asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis*. 2000; 26 (3): 208-212.
57. Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M, Carroll J. Sperm-triggered [Ca<sup>2+</sup>] oscillations and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development*. 2004; 131 (13): 3057–3067.
58. Dutta S, Mark-Kappeler CJ, Hoyer PB, Pepling ME. The steroid hormone environment during primordial follicle formation in perinatal mouse ovaries. *Biol Reprod*. 2014; 91 (3): 68.
59. Dutta S, Burks DM, Pepling ME. Arrest at the diplotene stage of meiotic prophase I is delayed by progesterone but is not required for primordial follicle formation in mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016; 14 (1): 82.
60. Eini F, Novin MG, Joharchi K, Hosseini A, Nazarian H, Piryaei A, Bidadkosh A. Intracytoplasmic oxidative stress reverses epigenetic modifications in polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil Dev*. 2017; 29 (12): 2313-2323.
61. Elkouby YM, Jamieson-Lucy A, Mullins MC. Oocyte Polarization Is Coupled to the Chromosomal Bouquet, a Conserved Polarized Nuclear Configuration in Meiosis. *PLoS Biol*. 2016; 14 (1): e1002335. doi: 10.1371/journal.pbio.1002335.
62. Eppig JJ. The Ovary: Oogenesis. In: Hilier SG, Kitchener HC, Neilson JP (Eds.). *Scientific Essentials of Reproductive Medicine*. USA: W.B. Saunders Company Ltd; 1996: 147-159.
63. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest*. 2009; 119 (7): 1763–1771.
64. Escobar-Aguirre M, Zhang H, Jamieson-Lucy A, Mullins MC. Microtubule-actin crosslinking factor 1 (Macf1) domain function in Balbiani body dissociation and nuclear positioning. *PLoS Genet*. 2017; 13 (9): e1006983. doi: 10.1371/journal.pgen.1006983.
65. Evans CW, Robb DI, Tuckett F, Challoner S. Regulation of meiosis in the foetal mouse gonad. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1982; 68: 59–67.
66. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*. 1992; 7 (10): 1342-1346.
67. Feinstein TN, Linstedt AD. Mitogen-activated protein kinase kinase 1-dependent Golgi unlinking occurs in G2 phase and promotes the G2/M cell cycle transition. *Mol Biol Cell*. 2007; 18 (2): 594-604.
68. Gard DL, Cha BJ, King E. The organization and animal-vegetal asymmetry of cytokeratin filaments in stage VI *Xenopus* oocytes is dependent upon F-actin and microtubules. *Dev Biol*. 1997; 184 (1): 95-114.
69. Gaytan F, Morales C, Leon S, Garcia-Galiano D, Roal J, Tena-Sempere M. Crowding and Follicular Fate: Spatial Determinants of Follicular Reserve and Activation of Follicular

- Growth in the Mammalian Ovary. *PLoS One*. 2015; 10 (12): e0144099. doi: 10.1371/journal.pone.0144099.
70. Ghafari F, Gutierrez CG, Hartshorne GM. Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Dev Biol*. 2007; 7: 87.
  71. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6<sup>th</sup> edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
  72. Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod*. 2006; 3: 2.
  73. Gruenbaum Y, Aebi U. Intermediate filaments: a dynamic network that controls cell mechanics. *F1000Prime Rep*. 2014; 6: 54. doi: 10.12703/P6-54.
  74. Guo M, Ehrlicher AJ, Mahammad S, Fabich H, Jensen MH, Moore JR, Fredberg JJ, Goldman RD, Weitz DA. The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic mechanics. *Biophys J*. 2013; 105 (7): 1562-1568.
  75. Gupta T, Marlow FL, Ferriola D, Mackiewicz K, Dapprich J, Monos D, Mullins MC. Microtubule actin crosslinking factor 1 regulates the Balbiani body and animal-vegetal polarity of the zebrafish oocyte. *PLoS Genet*. 2010; 6 (8): e1001073. doi: 10.1371/journal.pgen.1001073
  76. Hadziselimovic F, Hadziselimovic NO, Demougin P, Krey G, Oakeley EJ. Deficient expression of genes involved in the endogenous defense system against transposons in cryptorchid boys with impaired mini-puberty. *Sex Dev*. 2011; 5 (6): 287-293.
  77. Haglund K, Nezis IP, Stenmark H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. *Commun Integr Biol*. 2011; 4 (1): 1-9.
  78. Heeren AM, Iperen L, Klootwijk DB, Bernardo A, Roost M, Fernandes M, Louwe L, Hilders C, Helmerhorst F, Westerlaken L, Lopes S. Development of the follicular basement membrane during human gametogenesis and early folliculogenesis. *BMC Dev Biol*. 2015; 15: 4.
  79. Hertig AT, Adams EC. Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. *J Cell Biol*. 1967; 34 (2): 647-675.
  80. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*. 1991; 124: 43-101.
  81. Hirshfield AN. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats. *Biol Reprod*. 1992; 47 (3): 466-472.
  82. Hirshfield AN, DeSanti AM. Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. *Biol Reprod*. 1995; 53 (5): 1208-1221.

83. Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil.* 1986; 76 (2): 645–656.
84. Ikeda K, Baba T, Noguchi H, Nagasawa K, Endo T, Kiya T, Saito T. Excessive androgen exposure in female-to-male transsexual persons of reproductive age induces hyperplasia of the ovarian cortex and stroma but not polycystic ovary morphology. *Hum Reprod.* 2013; 28 (2): 453-461.
85. Ikenishi K. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev Growth Differ.* 1998; 40 (1): 1-10.
86. Jackson BW, Grund C, Schmid E, Bürki K, Franke WW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation.* 1980; 17 (3): 161-179.
87. Jia L, Li J, He B, Jia Y, Niu Y, Wang C, Zhao R. Abnormally activated one-carbon metabolic pathway is associated with mtDNA hypermethylation and mitochondrial malfunction in the oocytes of polycystic gilt ovaries. *Sci Rep.* 2016; 6: 19436. doi: 10.1038/srep19436.
88. Kabashima K, Matsuzaki M, Suzuki H. Intermediate filament keratin dynamics during oocyte maturation requires maturation/M-phase promoting factor and mitogen-activated protein kinase activities in the hamster. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45 (5): e184-e188.
89. Kezele P, Nilsson E, Skinner MK. Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front. Biosci.* 2002; 7: d1990-d1996.
90. Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod.* 1998; 13 (8): 2217–2222.
91. Kloc M, Bilinski S, Chan AP, Allen LH, Zearfoss NR, Etkin LD. RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol.* 2001; 203: 63–91.
92. Kloc M, Bilinski S, Dougherty MT, Brey EM, Etkin LD. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. *Dev Biol.* 2004; 266 (1): 43-61.
93. Kloc M, Etkin LD. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development.* 1995; 121 (2): 287–297.
94. Kloc M, Jaglarz M, Dougherty M, Stewart MD, Nel-Themaat L, Bilinski S. Mouse early oocytes are transiently polar: three-dimensional and ultrastructural analysis. *Exp Cell Res.* 2008; 314 (17): 3245-3254.
95. Kloc M, Larabell C, Chan AP, Etkin LD. Contribution of METRO pathway localized molecules to the organization of the germ cell lineage. *Mech Dev.* 1998; 75 (1-2): 81-93.
96. Kloc M, Wilk K, Vargas D, Shirato Y, Bilinski S, Etkin LD. Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development.* 2005; 132 (15): 3445-3457

97. Kloc M, Ghobrial RM, Borsuk E, Kubiak JZ. Polarity and Asymmetry During Mouse Oogenesis and Oocyte Maturation. *Results Probl Cell Differ.* 2012; 55: 23-44.
98. Kloc M, Larabell C, Etkin LD. Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol.* 1996; 180 (1): 119–130.
99. Koszul R, Kim KP, Prentiss M, Kleckner N, Kameoka S. Meiotic chromosomes move by linkage to dynamic actin cables with transduction of force through the nuclear envelope. *Cell.* 2008; 133 (7): 1188-1201.
100. Kubo A, Tsukita S. Non-membranous granular organelle consisting of PCM-1: subcellular distribution and cell-cycle-dependent assembly/disassembly. *J Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 5): 919-928.
101. Lei L, Spradling AC. Mouse oocytes differentiate through organelle enrichment from sister cyst germ cells. *Science.* 2016; 352 (6281): 95-99.
102. Liang LF, Soyal SM, Dean J. FIG $\alpha$ , a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development.* 1997; 124 (24): 4939–4947.
103. Löffler S, Horn LC, Weber W, Spänel-Borowski K. The transient disappearance of cytokeratin in human fetal and adult ovaries. *Anat Embryol.* 2000; 201 (3): 207–215.
104. Lopes CA, Prosser SL, Romio L, Hirst RA, O'Callaghan C, Woolf AS, Fry AM. Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral-facial-digital syndrome 1. *J Cell Sci.* 2011; 124 (Pt 4): 600-612.
105. Luksza M, Queguigner I, Verlhac MH, Brunet S. Rebuilding MTOCs upon centriole loss during mouse oogenesis. *Dev Biol.* 2013; 382 (1): 48-56.
106. Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod.* 2005; 72 (1): 2–13.
107. Marangos P, Carroll J. Fertilization and InsP3-induced Ca<sup>2+</sup> release stimulate a persistent increase in the rate of degradation of cyclinB1 specifically in mature mouse oocytes. *Dev Biol.* 2004; 272 (1): 26–38.
108. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010; 25 (2): 544–551.
109. \*Markova MD, Nikolova VP, Chakarova IV, Zhivkova RS, Dimitrov RK, Delimitreva SM. Intermediate filament distribution patterns in maturing mouse oocytes and cumulus cells. *Biocell.* 2015; 39 (1): 1–7.
110. Marlow FL. Oocyte Polarity and the Embryonic Axes: The Balbiani Body, an Ancient Oocyte Asymmetry. In: *Maternal Control of Development in Vertebrates: My Mother Made Me Do It!* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

111. Marlow FL, Mullins MC. Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal–vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish. *Dev Biol.* 2008; 321 (1): 40–50.
112. Marra P, Salvatore L, Mironov A Jr, Di Campli A, Di Tullio G, Trucco A, Beznoussenko G, Mironov A, De Matteis MA. The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol Biol Cell.* 2007; 18 (5): 1595–1608.
113. Maurizii MG, Saverino O, Taddei C. Cytokeratin cytoskeleton in the differentiating ovarian follicle of the lizard *Podarcis sicula Raf.* *Mol Reprod Dev.* 1997; 48 (4): 536-542
114. Maurya VM, Sangappa C, Kumar V, Mahfooz S, Singh A, Rajender S, Jha RK. Expression and activity of Rac1 is negatively affected in the dehydroepiandrosterone induced polycystic ovary of mouse. *J Ovarian Res.* 2014; 7: 32. doi: 10.1186/1757-2215-7-32.
115. May-Panloup P, Boucret L, Chao de la Barca JM, Desquirit-Dumas V, Ferré-L'Hotellier V, Morinière C, Descamps P, Procaccio V, Reynier P. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. *Hum Reprod Update.* 2016; 22 (6): 725-743.
116. McClellan KA, Gosden R, Taketo T. Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev Biol.* 2003; 258 (2): 334-348.
117. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; 21 (2): 200-214.
118. McLaren A. Establishment of the germ cell lineage in mammals. *J Cell Physiol.* 2000; 182 (2): 141–143.
119. Mendez MG, Restle D, Janmey PA. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys J.* 2014; 107 (2): 314-323.
120. Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem.* 1998; 31: 205-262.
121. Monk M, McLaren A. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1981; 63:75-84.
122. Moreno RD, Schatten G, Ramalho-Santos J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. *Biol Reprod.* 2002; 66 (5): 1259–1266.
123. Nicolas E, Chenouard N, Olivo-Marin JC, Guichet A. A dual role for actin and microtubule cytoskeleton in the transport of Golgi units from the nurse cells to the oocyte across ring canals. *Mol Biol Cell.* 2009; 20 (1): 556-568.
124. \*Nikolova VP, Delimitreva SM, Zhivkova RS, Chakarova IV, Hadzhinesheva VP, Markova MD. Immunocytochemical study of mouse oocytes suggests conserved keratin organisation in tetrapod oogenesis. *Acta Zool Bulg.* 2016; 68 (1): 35-38.
125. \*Nikolova V, Delimitreva S, Chakarova I, Zhivkova R, Hadzhinesheva V, Markova M. Dynamics of Lamins B and A/C and Nucleoporin Nup160 during Meiotic Maturation in Mouse Oocytes. *Folia Biol (Praha).* 2017; 63 (1): 6-12.

126. Okada M. Germline cell formation in *Drosophila* embryogenesis. *Genes Genet Syst.* 1998; 73 (1): 1-8.
127. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1127:1-9.
128. Parte S, Bhartiya D, Patel H, Daithankar V, Chauhan A, Zaveri K, Hinduja I. Dynamics associated with spontaneous differentiation of ovarian stem cells in vitro. *J Ovarian Res.* 2014; 7: 25. doi: 10.1186/1757-2215-7-25.
129. Payne C, Rawe V, Ramalho-Santos J, Simerly C, Schatten G. Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *J Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 23): 4727-4738.
130. Payne C, Schatten G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Dev Biol.* 2003; 264 (1): 50-63.
131. Pepling ME. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis.* 2006; 44 (12): 622-632.
132. Pepling ME, Spradling AC. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development.* 1998; 125 (17): 3323-3328.
133. Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol.* 2001; 234 (2): 339-351.
134. Pepling ME, Wilhelm JE, O'Hara AL, Gephardt GW, Spradling AC. Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (1): 187-192.
135. Pepling ME, Sundman EA, Patterson NL, Gephardt GW, Medico L Jr, Wilson KI. Differences in oocyte development and estradiol sensitivity among mouse strains. *Reproduction.* 2010; 139 (2):349-357.
136. Pepling ME. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction.* 2012; 143 (2): 139-149.
137. Peters H, Himelstein-Braw R, Faber M. The normal development of the ovary in childhood. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1976; 82 (3): 617-630.
138. Peters H, Byskov AG, Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *Clin Endocrinol Metab.* 1978; 7 (3): 469-485.
139. Plancha CE. Cytokeratin dynamics during oocyte maturation in the hamster requires reaching of metaphase I. *Differentiation.* 1996; 60 (2): 87-98.
140. Pritchett KR, Taft RA. Reproductive biology of the laboratory mouse. In: *The Mouse in Biomedical Research, Vol. 3: Normative Biology, Husbandry, and Models.* Elsevier; 2006: 94.
141. Racedo SE, Rawe VY, Niemann H. Dynamic changes of the Golgi apparatus during bovine in vitro oocyte maturation. *Reproduction.* 2012; 143 (4): 439-447.

142. Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn.* 1992; 194 (3): 177–192.
143. Ren Y, Suzuki H, Jagarlamudi K, Golnoski K, McGuire K, Lopes R, Pachnis V, Rajkovic A. Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biol.* 2015; 13:39.
144. Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2016; 58: 167–190.
145. Rodler, D., F. Sinowatz. Expression of intermediate filaments in the Balbiani body and ovarian follicular wall of the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Cells Tissues Organs.* 2013; 197 (4): 298–311.
146. Rogel MR, Soni PN, Troken JR, Sitikov A, Trejo HE, Ridge KM. Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 2011; 25 (11): 3873-3883.
147. Rose L, Gönczy P. Polarity establishment, asymmetric division and segregation of fate determinants in early *C. elegans* embryos. *WormBook.* 2014 Dec 30:1-43. doi: 10.1895/wormbook.1.30.2.
148. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004; 81 (1): 19-25.
149. Ruby JR, Dyer RF, Skalko RG. The occurrence of intercellular bridges during oogenesis in the mouse. *J Morphol.* 1969; 127 (3): 307–339.
150. Sánchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G, Smits J. Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Hum Reprod.* 2015; 30 (6): 1396-1409.
151. Santini D, Ceccarelli C, Mazzoleni G, Pasquinelli G, Jasonni VM, Martinelli GN. Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry.* 1993; 99 (4): 311-319.
152. Sathananthan AH, Selvaraj K, Trounson A. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 161 (1-2): 3-8.
153. Schnackenberg BJ, Khodjakov A, Rieder CL, Palazzo RE. The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95 (16): 9295-9300.
154. Schuh M, Ellenberg J. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell.* 2007; 130 (3): 484-498.
155. Shayya R, Chang RJ: Reproductive endocrinology of adolescent polycystic ovary syndrome. *BJOG.* 2010; 117 (2): 150 –155

156. Shibuya H, Morimoto A, Watanabe Y. The dissection of meiotic chromosome movement in mice using an in vivo electroporation technique. *PLoS Genet.* 2014; 10 (12): e1004821. doi: 10.1371/journal.pgen.1004821.
157. Sigala J, Sifer C, Dewailly D, Robin G, Bruyneel A, Ramdane N, Lefebvre-Khalil V, Mitchell V, Decanter C. Is polycystic ovarian morphology related to a poor oocyte quality after controlled ovarian hyperstimulation for intracytoplasmic sperm injection? Results from a prospective, comparative study. *Fertil Steril.* 2015; 103 (1): 112-118.
158. Song K, Ma W, Huang C, Ding J, Cui D, Zhang M. Expression Pattern of Mouse Vasa Homologue (MVH) in the Ovaries of C57BL/6 Female Mice. *Med Sci Monit.* 2016; 22: 2656-2663.
159. Spikings EC, Alderson J, St John JC. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod.* 2007; 76 (2): 327-335.
160. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod.* 2001; 64 (3): 904-909.
161. Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer C, Looijenga LH. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Reprod.* 2005; 20 (6): 1466-1476.
162. Strnad P, Paschke S, Jang KH, Ku NO. Keratins: markers and modulators of liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012; 28 (3): 209-216.
163. Sun Q, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction.* 2006; 131 (2): 193-205.
164. Sütterlin C, Hsu P, Mallabiabarrena A, Malhotra V. Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell.* 2002; 109 (3): 359-369.
165. Tada H, Taira Y, Morichika K, Kinoshita T. Mitochondrial trafficking through Rhot1 is involved in the aggregation of germinal granule components during primordial germ cell formation in *Xenopus* embryos. *Dev Growth Differ.* 2016; 58 (8): 641-650.
166. Takahashi Y., S. Hashimoto, T. Yamochi, H. Goto, M. Yamanaka, A. Amo, H. Matsumoto, M. Inoue, K. Ito, Y. Nakaoka, N. Suzuki, Y. Morimoto. Dynamic changes in mitochondrial distribution in human oocytes during meiotic maturation. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33 (7): 929-938.
167. Takatsuki A, Nakamura M, Kono Y. Possible implication of Golgi-nucleating function for the centrosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291 (3): 494-500.
168. \*Takeva Z. On the formation of corpus Albani in the ovogonia of man and guinea-pig. *Experientia.* 1976; 32 (4): 509-511.

169. te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 145(1-2): 67–73.
170. Teng Z, Wang C, Wang Y, Huang K, Xiang X, Niu W, Feng L, Zhao L, Yan H, Zhang H. Gap junctions are essential for murine primordial follicle assembly immediately before birth. *Reproduction.* 2016; 151 (2): 105-115.
171. Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod.* 2009; 15 (12): 795–803.
172. Tollenaere MA, Mailand N, Bekker-Jensen S. Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72 (1): 11-23.
173. Torpey N, Wylie CC, Heasman J. Function of maternal cyokeratin in *Xenopus* development. *Nature.* 1992; 357 (6377): 413-415.
174. Townson DH, Combelles CMH. Ovarian Follicular Atresia. Chapter 2. In: Darwish A (Ed.). *Basic Gynecology - Some Related Issues.* In Tech; 2012.
175. Valente C, Colanzi A. Mechanisms and Regulation of the Mitotic Inheritance of the Golgi Complex. *Front Cell Dev Biol.* 2015; 3:79. doi: 10.3389/fcell.2015.00079.
176. Van Blerkom J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88 (11): 5031–5035.
177. Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol.* 2000; 10 (20): 1303–1306.
178. Walters KA. Androgens in polycystic ovary syndrome: lessons from experimental models. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016; 23 (3): 257-263.
179. Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN. Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. *Biol Reprod.* 2000; 62 (5): 1177-1183.
180. Wang S, Alvero R. Racial and ethnic differences in physiology and clinical symptoms of polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med.* 2013; 31 (5): 365–369.
181. Wang L, Wang ZB, Zhang X, FitzHarris G, Baltz JM, Sun QY, Liu XJ. Brefeldin A disrupts asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Dev Biol.* 2008; 313 (1): 1155-66.
182. Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN. Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. *Biol Reprod.* 2000; 62 (5): 1177–1183.
183. Wang Y, Teng Z, Li G, Mu H, Wang Z, Feng L, Niu W, Huang K, Xiang X, Wang C, Zhang H, Xia G. Cyclic AMP in oocytes controls meiotic prophase I and primordial folliculogenesis in the perinatal mouse ovary. *Development.* 2015; 142 (2): 343-351.

184. Wear HM, McPike MJ, Watanabe KH. From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. *J Ovarian Res.* 2016; 9 (1): 36.
185. Webber LJ, Stubbs SA, Stark J, Margara RA, Trew GH, Lavery SA, Hardy K, Franks S. Prolonged survival in culture of preantral follicles from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92 (5): 1975-1978.
186. Weber KL, Bement WM. F-actin serves as a template for cytokeratin organization in cell free extracts. *J Cell Sci.* 2002; 115 (Pt 7): 1373-1382.
187. Wei X, Xiangwei F, Guangbin Z, Jing X, Liang W, Ming D, Dianshuai Y, Mingxing Y, Jianhui T, Shien Z. Cytokeratin distribution and expression during the maturation of mouse germinal vesicle oocytes after vitrification. *Cryobiology.* 2013; 66 (3): 261-266.
188. Welch MD, Mallavarapu A, Rosenblatt J, Mitchison JJ. Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9 (1): 54-61.
189. White J, Strome S. Cleavage plane specification in *C. elegans*: how to divide the spoils. *Cell.* 1996; 84 (2): 195-198.
190. Wilk K, Bilinski S, Dougherty MT, Kloc M. 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.* 2005; 49 (1): 17-21.
191. Wilson C, Venditti R, Rega L, Colanzi A, D'Angelo G, De Matteis MA. The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem J.* 2011; 433 (1): 1-9.
192. Xu J, Gridley T. Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biol.* 2013;11: 13.
193. Yadav S, Linstedt AD. Golgi positioning. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3 (5). pii: a005322. doi: 10.1101/cshperspect.a005322.
194. Yoshida H, Takakura N, Katoaka H, Kunisada T, Okamura H, and Nishikawa SL. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol.* 1997; 184 (1): 122-137.
195. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010; 140 (4): 489-504.
196. Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol.* 2010; 224 (3): 672-680.
197. Zelenka R, Habrová V, Romanovský A, Hanin V, Van Heyningen V. Distribution of nonmuscle actin during *Xenopus laevis* development. *Folia Biol (Praha).* 1992; 38 (5): 316-322.
198. Zeleznik AJ, Hilier SG. The Ovary: Endocrine function. In: Hilier SG, Kitchener HC, Neilson JP (Eds.). *Scientific Essentials of Reproductive Medicine.* USA: W.B. Saunders Company Ltd. 1996: 133-146.

199. Zernicka-Goetz M, Kubiak JZ, Antony C, Maro B. Cytoskeletal organization of rat oocytes during metaphase II arrest and following abortive activation: A study by confocal laser scanning microscopy. *Mol Reprod Dev.* 1993; 35 (2): 165–175.
200. Zhang X, Wang Y. GRASPs in Golgi Structure and Function. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 3: 84. doi: 10.3389/fcell.2015.00084.
201. Zheng W, Zhang H, Gorre N, Risal S, Shen Y, Liu K. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Hum Mol Genet.* 2014; 23 (4): 920-928.
202. Zhu ZY, Chen DY, Li JS, Lian L, Lei L, Han ZM, Sun QY. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2003; 68 (3): 943-946.
203. Zimmerman W, Doxsey SJ. Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles. *Traffic.* 2000; 1 (12): 927-934.
204. Zoubovsky S, Oh EC, Cash-Padgett T, Johnson AW, Hou Z, Mori S, Gallagher M, Katsanis N, Sawa A, Jaaro-Peled H. Neuroanatomical and behavioral deficits in mice haploinsufficient for Pericentriolar material 1 (Pcm1). *Neurosci Res.* 2015; 98: 45-49.