

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
MEDICINOS FAKULTETAS
HISTOLOGIJOS IR EMBRIOLOGIJOS KATEDRA

Beatričė Aleksaitė

0-10 MĖNESIŲ AMŽIAUS MERGAIČIŲ KIAUŠIDŽIŲ UŽUOMAZGINIŲ
FOLIKULŲ MORFOMETRINĖ ANALIZĖ

Medicinos vientisųjų studijų programos baigiamasis magistro darbas

Darbo vadovas:
Doc. Kristina Lasienė

Kaunas, 2017

TURINYS

1. SANTRAUKA	4
2. SUMMARY	5
3. PADĖKA	6
4. INTERESŲ KONFLIKTAS	6
5. ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS	6
6. SANTRUMPOS	7
7. SĄVOKOS	8
8. ĮVADAS	9
9. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
9.1. Darbo tikslas	10
9.2. Darbo uždaviniai	10
10. LITERATŪROS APŽVALGA	11
10.1. Prenatalinis laikotarpis	11
10.2. Postnatalinis ir reprodukcinis laikotarpiai	12
11. TYRIMO METODIKA	17
11.1. Tyrimo objektas	17
11.2. Tiriamųjų atranka	17
11.3. Tyrimo organizavimas ir metodai	17
11.3.1. Histologinės medžiagos fiksavimas	17
11.3.2. Histologinės medžiagos paruošimas pjautymui	17
11.3.3. Užliejimas parafinu	17
11.3.4. Histologinės medžiagos pjautymas	18
11.3.5. Nuopjovų dažymas, uždengimas bei preparatų žymėjimas	18
11.3.6. Histologinių preparatų tyrimas	18
11.4. Duomenų analizės metodai	18
12. REZULTATAI	19
12.1. 0–10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų morfometrinė charakteristika	19
12.2. 0–10 mėn. amžiaus mergaičių bei užuomazginių kiaušidės folikulų morfometrinių duomenų tarpusavio ryšys	26
12.3. 0–10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų morfometrinių duomenų tarpusavio ryšys	28

13. REZULTATŲ APTARIMAS	29
14. IŠVADOS	32
15. LITERATŪROS SĄRAŠAS	33

1. SANTRAUKA

Beatričė Aleksaitė

0-10 MĖNESIŲ AMŽIAUS MERGAIČIŲ KIAUŠIDŽIŲ UŽUOMAZGINIŲ FOLIKULŲ MORFOMETRINĖ ANALIZĖ

Tikslas. Histologiškai ištirti 0-10 mėnesių amžiaus mergaičių kiaušidžių užuomazginius folikulus, atlikti jų morfometrinę analizę ir išanalizuoti gautus rezultatus.

Uždaviniai:

1. Atlikti 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų ir juose esančių pirminių oocitų morfometrinius matavimus;
2. Nustatyti ryšį tarp mergaičių amžiaus, užuomazginių kiaušidės folikulų ir juose esančių pirminių oocitų morfometrinių duomenų;
3. Nustatyti ryšį tarp folikulo, oocito, oocito branduolio, folikulinių ląstelių, pamatinės membranos morfometrinių duomenų.

Metodai. Tyrimas atliktas naudojant penkių mirusių 0-10 mėn. amžiaus mergaičių kiaušidžių histologinius preparatus. Kiekvienos mergaitės kiaušidėje tirta po 10 užuomazginių folikulų. Matuotas užuomazginio folikulo skersmuo, plotas ir perimetras, pirminio oocito skersmuo, plotas ir perimetras, oocito branduolio skersmuo, plotas ir perimetras, trijų folikulinių ląstelių ilgis, aukštis, plotas ir perimetras (išvestas vidurkis), pamatinės membranos storis. Statistinė analizė atlikta naudojant SPSS 20.0 statistinį paketą.

Rezultatai. Užuomazginių folikulų skersmenų vidurkis svyravo nuo $4,97 \pm 0,37 \mu\text{m}$ iki $6,05 \pm 1,44 \mu\text{m}$, pirminių oocitų – nuo $3,58 \pm 0,29 \mu\text{m}$ iki $3,77 \pm 0,32 \mu\text{m}$, oocitų branduolių – nuo $1,49 \pm 0,16 \mu\text{m}$ iki $1,60 \pm 0,18 \mu\text{m}$, folikulinių ląstelių ilgių – nuo $0,53 \pm 0,03 \mu\text{m}$ iki $0,77 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Rastas ryšys tarp amžiaus ir užuomazginio folikulo ploto ($p = 0,041$, $r = -0,290$), oocito ploto ($p = 0,017$, $r = -0,335$), folikulinės ląstelės perimetro ($p = 0,003$, $r = -0,414$). Gautos statistiškai reikšmingas koreliacijos tarp: užuomazginio folikulo ir pirminio oocito plotų ($p < 0,05$, $r = 0,921$), folikulo ir pirminio oocito skersmenų ($p < 0,05$, $r = 0,289$), užuomazginio folikulo skersmens ir pamatinės membranos storio ($p < 0,05$, $r = -0,374$), užuomazginio folikulo ir oocito perimetrų ($p < 0,05$, $r = 0,591$).

Išvados. Užuomazginių folikulų skersmenų vidurkis svyravo nuo $4,97 \pm 0,37 \mu\text{m}$ iki $6,05 \pm 1,44 \mu\text{m}$, plotų vidurkis – nuo $10,19 \pm 0,78 \mu\text{m}^2$ iki $11,57 \pm 1,79 \mu\text{m}^2$, perimetrų vidurkis – nuo $11,69 \pm 0,87 \mu\text{m}$ iki $12,17 \pm 1,04 \mu\text{m}$. Rastas ryšys tarp amžiaus ir morfometrinių užuomazginių folikulų parametrų. Ryškiausia koreliacija tarp amžiaus ir folikulinės ląstelės perimetro. Taip pat egzistuoja koreliacija tarp pačių morfometrinių parametrų.

2. SUMMARY

Beatričė Aleksaitė

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF 0-10 MONTHS OLD GIRLS PRIMORDIAL OVARIAN FOLLICLES

The aim. To analyze histologically primordial ovarian follicles of 0–10 months old girls, to carry out their morphometric analysis and perform analysis of the results.

Objectives:

1. To perform morphometric analyze of 0-10 months old girls primordial ovarian follicles and their primary oocytes;
2. To evaluate the association between girl's age and morphometric data;
3. To evaluate the association between morphometric data of follicles, oocytes, oocytes nuclei, follicular epithelial cells, basement membranes.

Methods. In this study, histological slides of five 0-10 months old girls' ovaries were examined. 10 primordial ovarian follicles were analyzed in each ovary. Measurements of diameter, area and perimeter of primordial follicles, oocytes and oocytes nuclei were performed, follicular epithelial cells length, height, area and perimeter, basement membrane thickness were measured. Statistical analysis was performed with SPSS 20.0 package.

Results. Ovarian primordial follicles average diameter was from $4,97 \pm 0,37 \mu\text{m}$ to $6,05 \pm 1,44 \mu\text{m}$, oocytes – from $3,58 \pm 0,29$ to $3,77 \pm 0,32 \mu\text{m}$, oocytes nuclei – from $49 \pm 0,16 \mu\text{m}$ to $1,60 \pm 0,18 \mu\text{m}$, follicular epithelial cells average length – from $0,53 \pm 0,03 \mu\text{m}$ to $0,77 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Associations between girl's age and primordial follicles area ($p = 0.41$, $r = -0.290$), oocytes area ($p = 0.017$, $r = -0.335$), follicular epithelial cells perimeter ($p = 0.003$, $r = -0.414$) were determined. Statistically significant correlations were found between: areas of primordial follicle and oocyte ($p < 0,05$, $r = 0,921$), diameters of follicle and oocyte ($p < 0,05$, $r = 0,289$), follicle diameter and thickness of basement membrane ($p < 0,05$, $r = -0,374$), perimeters of follicle and oocyte ($p < 0,05$, $r = 0,591$).

Conclusions. Ovarian primordial follicles average diameter was from $4,97 \pm 0,37 \mu\text{m}$ to $6,05 \pm 1,44 \mu\text{m}$, area – from $10,19 \pm 0,78 \mu\text{m}^2$ to $11,57 \pm 1,79 \mu\text{m}^2$, perimeter – from $11,69 \pm 0,87 \mu\text{m}$ to $12,17 \pm 1,04 \mu\text{m}$. There is an association between girl's age and primordial follicles morphometric data, the most pronounced correlation is between age and follicular epithelial cells perimeter. Also there is correlation among morphometric data itself.

3. PADĖKA

Dėkoju baigiamojo magistro darbo vadovei docentei Kristinai Lasienei už skirtą laiką ir pastabas.

4. INTERESŲ KONFLIKTAS

Autoriui interesų konflikto nebuvo.

5. ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS

Tyrimui atlikti gautas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Bioetikos centro (LSMU BEC) leidimas Nr. BEC-MF-234 (2017-01-19).

6. SANTRUMPOS

FL	- folikulinės ląstelės
FTH	- fosfatazės ir tensino homologas (angl. <i>PTEN</i>)
GL	- grūdėtosios folikulinės ląstelės (angl. <i>GCs</i>)
PF	- priešovuliacinis folikulas
PKN	- priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas (angl. <i>POF</i>)
RBF	- ramybės būsenos folikulai (angl. <i>NGF</i>)
RK1	- rapamicino kompleksas 1 (angl. <i>mTORC1</i>)
TST1	- tumorų supresinis tuberosklerozinis kompleksas 1 (angl. <i>Tsc1</i>)

7. SĄVOKOS

1. Aneuploidija – chromosomų skaičiaus padidėjimas arba sumažėjimas.
2. Kamieninės ląstelės – organizmo ląstelės, gebančios diferencijuotis ir įgyti specifinių organizmui reikalingų funkcijų, įsitraukti į sužaloto organo atkūrimą.
3. Menarchė – pirmosios mėnesinės.
4. Priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas (PKN) – tai būklė, kai kiaušidėse yra mažai užuomazginių folikulų arba jie silpnai reaguoja į adenohipofizės endokrinocitų išskiriamus hormonus (folikulus stimuliuojantį ir liuteinizuojantį hormonus).
5. Ramybės būsenos folikulai – tai užuomazginiai, tarpiniai ir pirminiai folikulai.
6. Subfertilitetas – vaisingumo sumažėjimas.
7. Zona pellucida – skaidrioji zona.

8. ĮVADAS

Moters reprodukcinė sistema – tai sudėtingų, tarpusavyje sąveikaujančių elementų visuma. Viena svarbiausių šios sistemos dalių yra kiaušidės, kurių funkcinis vienetas - folikulas. Kiaušidėse vyksta folikulogenezė, oogenezė ir lytinių hormonų sintezė [1]. Folikulogenezės metu bręsta toks folikulų skaičius, kuris reikalingas genų tęstinumui užtikrinti. Užuomazginiame folikule pirminį oocitą supa folikulinės ląstelės (FL), kurios, folikului augant, diferencijuojasi į grūdėtąsias folikulines ląsteles (GL) [2]. Todėl vienas iš pagrindinių skirtumų tarp įvairių grupių folikulų – oocitą supančių FL ir GL forma bei kiekis. Folikulogenezė prasideda apie 13-ą vaisiaus formavimosi savaitę. Tuo metu jau įmanoma histologiškai nustatyti užuomazginius folikulus. Visą vaisiaus formavimosi laikotarpį vyksta užuomazginių folikulų formavimasis, kuris gimimo metu būna beveik pasibaigęs. Kiaušidėje folikulai sudaro du pagrindinius funkcinis telkinius – ramybės būsenos (poilsio) ir augančių folikulų. Kiekvienas iš jų turi savo funkciją. Kiaušidės rezervą atspindi ramybės būsenos folikulų telkinys, kuriame esantys folikulai yra naudojami visą moters reprodukcinį laikotarpį. Ramybės būsenoje esantys užuomazginiai folikulai, veikiami hormonų bei inhibuojančių molekulių, virsta pirminiais, po to - antriniais folikulais. Šie bręsta iki Grafo (tretinio) folikulo. Plyšus tretiniam folikului, subrendęs oocitas išsilaisvina iš kiaušidės – įvyksta ovuliacija [3, 4].

Naujagimės mergaitės kiaušidėse yra apie 1×10^6 užuomazginių folikulų [5]. Juose išskiriamos morfologinės struktūros: pirminis oocitas su branduoliu, plokščios folikulinės ląstelės ir pamatinė membrana. Lietuvos literatūroje duomenų apie 0–10 mėnesių amžiaus mergaičių užuomazginių folikulų morfometrinę analizę neradome. Užsienio literatūroje dažniausiai aptariami su amžiumi susiję molekuliniai ir ląsteliniai folikulų ir oocitų ypatumai. Morfometriniai ir morfologiniai moterų kiaušidžių folikulų tyrimai sudėtingi dėl techninių bei bioetinių aspektų. Tačiau svarbu ir tai, kad tiesioginis ištisinis moterų kiaušidžių folikulų augimo tyrinėjimas nėra galimas [6].

0–10 mėnesių amžiaus mergaičių užuomazginių folikulų detalus ištyrimas svarbus anatominiu, histologiniu bei evoliuciniu požiūriu. Šie tyrimai gali padėti įvertinti reprodukcinės galimybes ar galimus sveikatos sutrikimus, susijusius su kiaušidės folikulų ir oocitų morfologiniais bei morfometriniais ypatumais. Tai gali būti pagrindas tolimesniems tyrimams.

9. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

9.1. Darbo tikslas

Histologiškai ištirti 0-10 mėnesių amžiaus mergaičių kiaušidžių užuomazginius folikulus, atlikti jų morfometrinę analizę ir išanalizuoti gautus rezultatus.

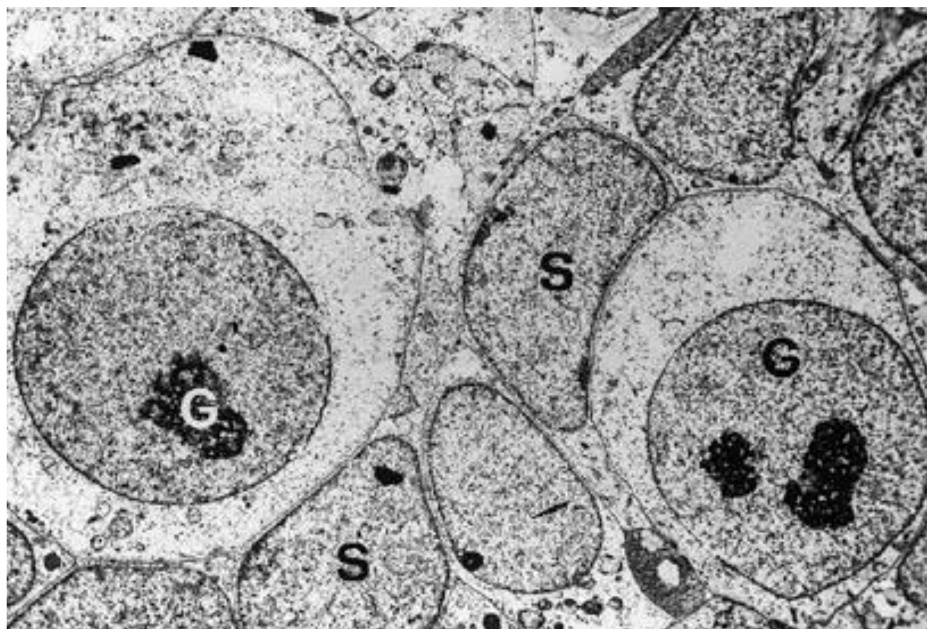
9.2. Darbo uždaviniai

1. Atlikti 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų ir juose esančių pirminių oocitų morfometrinius matavimus;
2. Nustatyti ryšį tarp mergaičių amžiaus, užuomazginių kiaušidės folikulų ir juose esančių pirminių oocitų morfometrinių duomenų;
3. Nustatyti ryšį tarp folikulo, oocito, oocito branduolio, folikulinių ląstelių, pamatinės membranos morfometrinių duomenų.

10. LITERATŪROS APŽVALGA

10.1. Prenatalinis laikotarpis

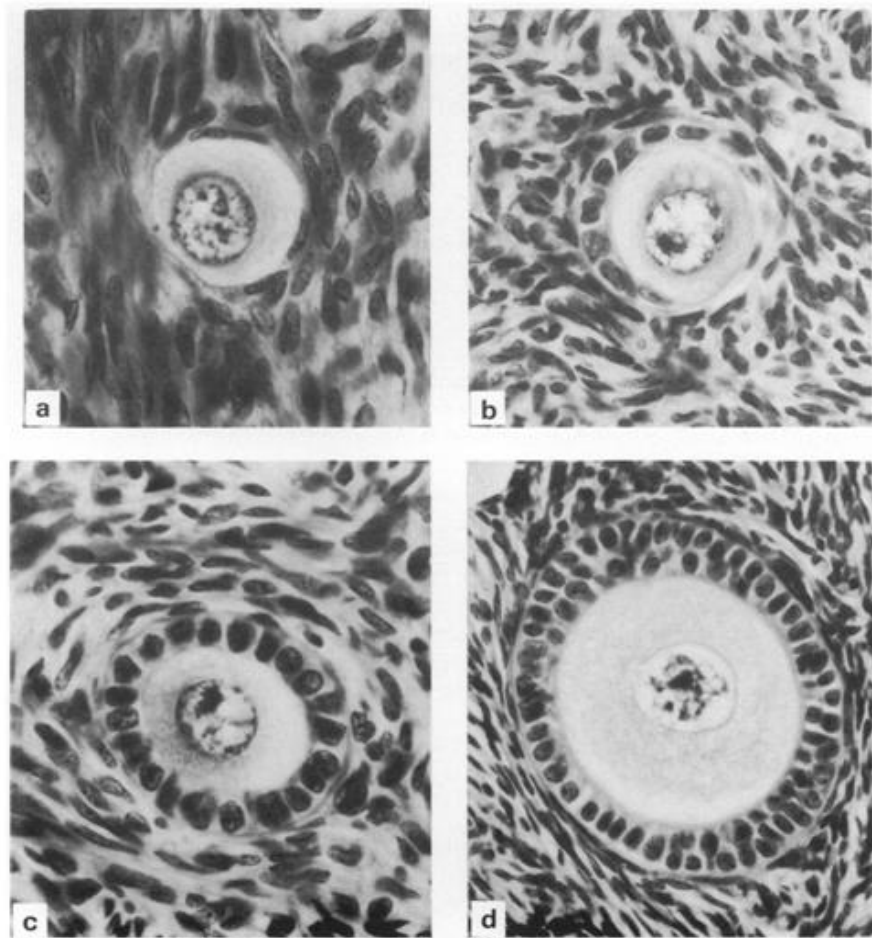
Prenatalinis laikotarpis tęsiasi nuo apvaisinimo iki gimimo. Šį laikotarpį galima suskirstyti į du periodus – embriono ir vaisiaus. Embrioniniu periodu prasideda oogenezė. Šis procesas prasideda trynio maišo endodermoje formuojantis užuomazginėms lytinėms ląstelėms (gonocitams). Jos proliferuoja bei migruoja iš trynio maišo ir besiformuojančioje kiaušidėje tampa oogonijomis. Visos oogonijos tarpusavyje jungiasi citoplazmos tilteliais. Somatinės ląstelės, esančios besiformuojančios kiaušidės žievėje ir šerdyje, apsupa oogonijas (1 pav.). Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad šiuo laikotarpiu kiaušidėje yra apie 7×10^6 oogonijų [5]. 8–13 vaisiaus formavimosi savaitę oogonijos pradeda I mejozinį dalijimąsi, kuris sustoja I profazėje – susiformuoja pirminiai oocitai. Šerdinėje kiaušidės dalyje esančios oogonijos mejoziškai dalintis pradeda anksčiau nei esančios periferijoje. Manoma, kad tai turi įtakos ir tolimesniam užuomazginių folikulų aktyvinimui. Šiuo laikotarpiu sunyksta citoplazmos tilteliai ir pirminiai oocitai apsupami folikulinių ląstelių (FL), kurios, manoma, yra kilusios iš kiaušidės paviršiaus epitelinių ląstelių [7, 8]. Prasideda pokyčiai oocito citoplazmoje – vyksta baltymų sintezė, informacinės RNR transkripcija. Taip pat joje vyksta DNR replikacija, homologinių chromosomų rekombinacija ir susiporavimas [9]. Visi procesai būtini oocitui subręsti, zigotos genomui aktyvinti ir blastocistai formuotis. Oocito kokybė turi svarbią įtaką embriono raidos potencialui bei ilgam reprodukciniam laikotarpiui, kuris gali tęstis iki penkių dešimtmečių [10].



1 pav. Oogonijos, apsuptos somatinėmis ląstelėmis [11]

G – oogonija, S – somatinė ląstelė

Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad užuomazginiame folikule pirminį oocitą supančios folikulinės ląstelės (FL) sudaro vieną sluoksnį ir yra plokščios formos (2 pav.) [7]. Užuomazginiame folikule jų yra apie 13, o pirminiame folikule kubinių folikulinų ląstelių skaičius siekia maždaug 76 [4].



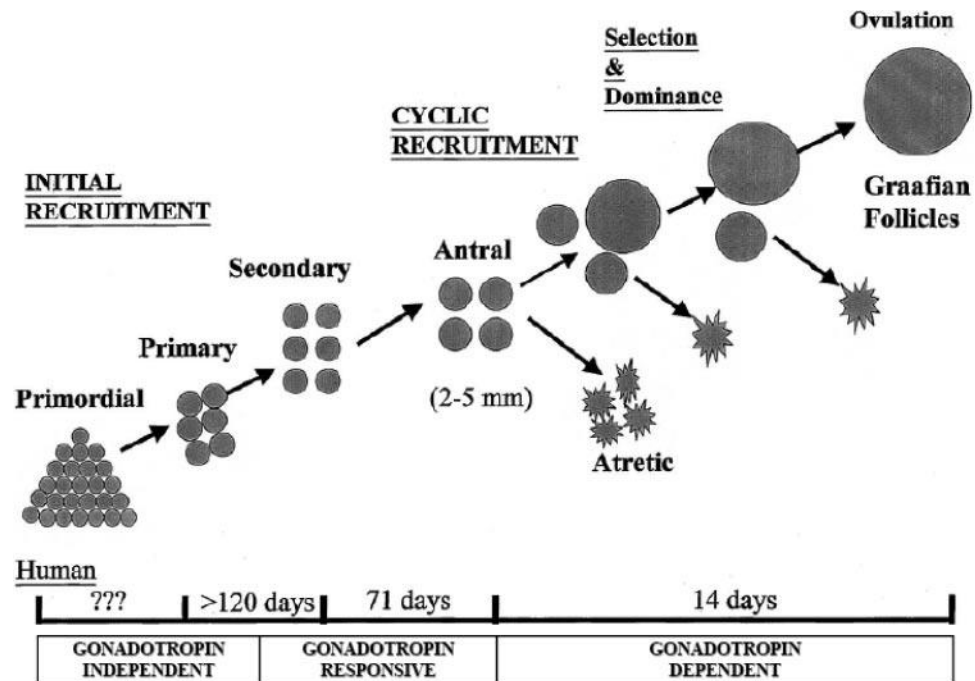
2 pav. Užuomazginio, tarpinio ir pirminio folikulų morfologija [7]

a – užuomazginis folikulas su vienu plokščių folikulinų ląstelių sluoksniu, b - tarpinis folikulas su vienu plokščiųjų ir kubinių folikulinų ląstelių sluoksniu, c – pirminis folikulas su vienu kubinių folikulinų ląstelių sluoksniu, d – pirminis folikulas su keletu kubinių folikulinų ląstelių sluoksnių

10.2. Postnatalinis ir reprodukcinis laikotarpiai

Po gimimo kiaušidėje vyksta užuomazginių folikulų augimas. Šio laikotarpio metu užuomazginio folikulo oocito skersmuo reikšmingai padidėja [1]. Koks kiekis pirminių oocitų pereis į sekantį vystymosi etapą, priklauso nuo užuomazginių folikulų kiekio, kuris atspindi bendrąjį kiaušidės rezervą [12].

2009 metais Australijos mokslininkai tyrinėjo folikulų augimą reguliuojančius mechanizmus. Šių tyrimų rezultatai rodo, kad užuomazginio folikulo augimo svarbiausi veiksniai yra specifiniai citokinai, augimo faktorius, transkripcijos faktorius, fosfatazės ir angiotenzino homologai. Visos šios medžiagos dalyvauja pradiname augimo etape. Tačiau kitų tyrimų metu nustatyta, kad antrinių folikulų formavimuisi didžiausią įtaką turi gonadotropiniai hormonai, kurie folikulų brendimą stimuliuoja cikliška (3 pav.) [8, 13].



3 pav. Gonadotropinių hormonų veikimas skirtingais folikulų vystymosi etapais [13]

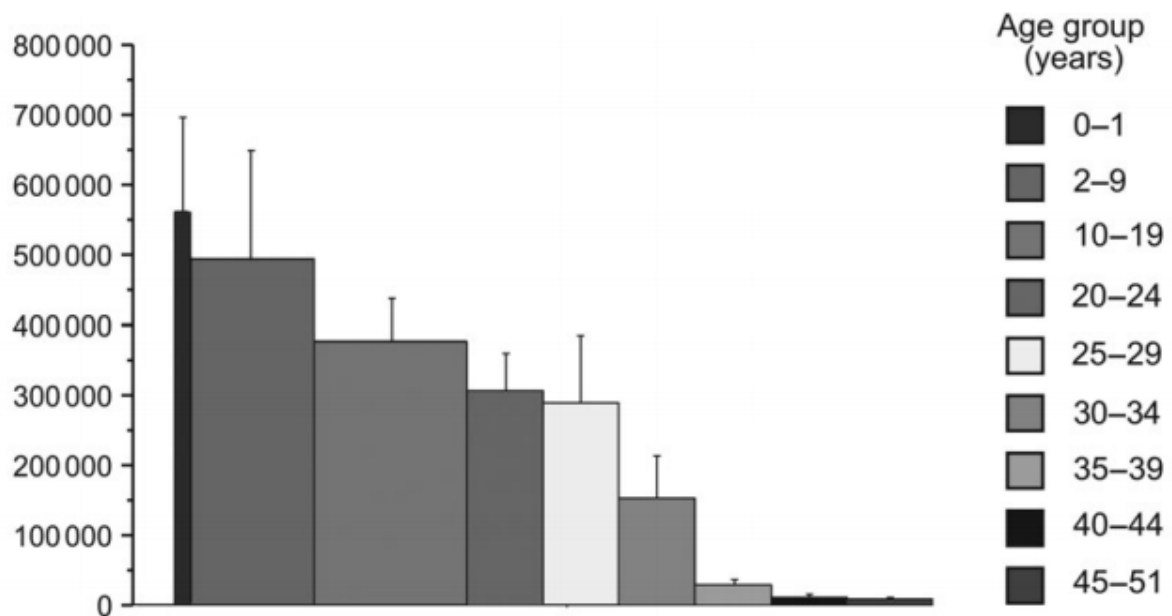
Po gimimo kiaušidėje vyksta ne tik užuomazginių folikulų augimas, bet ir žuvimas (atrezija). Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad naujagimės kiaušidėse yra apie 1×10^6 užuomazginių folikulų. Šis kiekis su amžiumi mažėja, ir sulaukus menarchės užuomazginių folikulų lieka apie 300 000 [5].

Italijoje 2002 metais tyrimų metu buvo iškelta produkcinės eilės hipotezė, kuri teigia, jog anksčiausiai susiformavusių folikulų kokybė yra aukščiausia. Tai reiškia, kad tuo metu, kada prasideda pirmosios mėnesinės, folikulų kokybė yra pati geriausia. Tačiau laikui einant ji prastėja [14]. Dėl šios priežasties didesnis dėmesys turėtų būti atkreipiamas į užuomazginių, tarpinių bei pirminių folikulų (RBF) kiekį, kuris atspindi moters reprodukcinį amžių [15].

2014 metais Vokietijoje atliktų studijų metu nustatyta, kad tik apie 1% visų oocitų ovuliuoja. Likusi dalis dėl atrezijos sunyksta. Folikulų aktyvinimas vyksta visą reprodukcinį laikotarpį, net ankstyvame nėštumo periode bei vartojant kontraceptikus. Tačiau šis procesas stipriai priklauso nuo moters amžiaus. Nuo 20-ies metų amžiaus per mėnesį aktyvuojama daugiau nei 1400 ramybės būsenos

folikulų. Tačiau penkiasdešimties metų amžiaus moterims šis skaičius sumažėja iki 30-ies folikulų per mėnesį. Folikulų aktyvinimo mechanizmai neturi įtakos vykstančiai atrezijai. Folikulai gali nykti nuo menstruacijų ciklo priklausančiu ir nepriklausančiu keliu, o pastarieji keičiasi su amžiumi. Tyrimo metu padaryta išvada, kad daugiau neaktyvių folikulų vis dėlto prarandama jauname amžiuje. Šio proceso reguliavimo mechanizmas dar nėra aiškus [6].

Yra atlikta nemažai tyrimų, kurių metu buvo nagrinėjama užuomazginių kiaušidės folikulų kiekio priklausomybė nuo amžiaus (4 pav.). Nustatyta, kad didžiausias vaisingumas yra apie 25-uosius gyvenimo metus, o folikulų mažėjimas padvigubėja, kai jų lieka kritinė (mažiau nei 25000) riba, moteriai sulaukus apie 37,5 metų. Tačiau svarbus faktas yra tai, kad ne amžius, o kritinė folikulų riba lemia menopauzės atsiradimą. Ta riba, kai folikulų lieka <25000 , pasiekama likus apie 13 metų iki menopauzės ir šis laiko tarpas yra stabilus. Manoma, jog ir subfertiliteto pradžia prasideda fiksuotu metu, todėl žinant menopauzės pradžią šį laikotarpį kiekvienai moteriai būtų galima nuspėti individualiai [16]. Reguliarų mėnesinių ciklą turinčių moterų kiaušidėse yra apie 10 kartų didesnis užuomazginių folikulų skaičius nei tų moterų, kurių menstruacinis ciklas nereguliarus. Apskaičiuota, jog laikotarpis tarp menstruacijų reguliarumo dingimo ir menopauzės atsiradimo yra 6-eri metai, o bendrojoje populiacijoje apie 10% moterų menopauzė prasideda 45-aisiais jų gyvenimo metais. Tai svarbus faktas, nes keliama hipotezė, kad šioms moterims nuo 32 metų amžiaus gali būti asimptomiškai sumažėjęs vaisingumas. Taip pat moterims, kurioms prognozuojama ankstyva menopauzė, būna didesnė persileidimų bei aneuploidijos rizika, didesnė tikimybė susilaukti dizigotinių dvynių. Dar nėra atlikta pakankamai mokslinių tyrimų, kurie leistų tiksliai iš anksto nustatyti, kurioms moterims gresia ankstyva menopauzė, tačiau didesnis dėmesys turėtų būti skiriamas tom, kurių šeiminėje anamnezėje yra ankstyvos menopauzės atvejų, buvo taikyta chemoterapija ar jos sirgo dubens organų ligomis [17, 18].



4 pav. Užumazginių folikulų skaičiaus kitimai moters kiaušidėje amžiaus eigoje [17]

Su amžiumi atsiranda ir ultrastruktūrinių oocitų pokyčių: padidėjusi citoplazmos vakuolizacija, mitochondrijų skaičiaus pakitimai [19]. Folikulo atrezijos metu oocite pastebimas vakuolių skaičiaus padidėjimas lygiajame endoplazminiame tinkle, netaisyklinga mitochondrijų forma ir pasikeitęs jų matrikso tankis bei Goldžio komplekso išsiplėtimas. Kuo labiau pažengusi atrezija, tuo ryškesni visi šie pakitimai. Ankstyvieji mitochondrijų pažeidimai rodo neigiamą laisvųjų deguonies radikalų poveikį [14].

Jungtinėse Amerikos Valstijose 2009 metais buvo ieškoma būdų, kaip apskaičiuoti folikulų mažėjimą. Nustatyta, kad ramybės būsenos folikulų mažėjimas apibūdinamas funkcija $\log(y)=ax^b+c$, kur a , b ir c yra konstantos, o y = RBF skaičius x amžiuje ($R^2=0,84$, standartinis nuokrypis 28,18 ir 119 laisvės laipsnių). Šie skaičiavimai rodo, kad folikulų atrezija greitėja didėjant amžiui. Nepaisant normalios lytinių hormonų sekrecijos, fiziologinis vaisingumas vis tiek mažėja [17].

Molekuliniai mechanizmai, kurie reguliuoja folikulų augimą ir brendimą, yra labai sudėtingi. 2012 metais ištirta, kad egzistuoja labai svarbus ryšys tarp užumazginio folikulo oocito ir folikulinių ląstelių, kurios dalyvauja oocito brendimo procese [20]. Viena iš svarbiausių medžiagų – tai tumoro supresinis tuberosklerozinis kompleksas 1 (TST1). Jis dar vadinamas hemartinu [21]. TST1 – tai baltymas, kuris padeda užumazginius folikulus išlaikyti ramybės būsenoje, supresiškai veikiant rapamicino kompleksą 1 (RK1). RK1 – tai kompleksas baltymų, kurie tiekia energiją kitų baltymų sintezei. Trūkstant hemartino, užumazginiai folikulai yra per anksti aktyvuojami. Tai turi įtakos ankstyvam užumazginių folikulų rezervo išsekvojimui ir ankstyvam vaisingumo mažėjimui. Hemartinas sinergistiškai veikia su fosfatazės ir tensino homologu (FTH). FTH slopina užumazginių folikulų

aktyvinimą. Visų šių medžiagų molekulių sinergistinis veikimas reguliuoja reprodukcinio amžiaus trukmę, veikiant užuomazginių folikulų ramybės ir aktyvacijos būsenas. Šių reguliacinių mechanizmų sutrikimas gali lemti moters nevaisingumą bei priešlaikinį kiaušidžių nepakankamumą (PKN) [22].

11. TYRIMO METODIKA

11.1. Tyrimo objektas

0-10 mėnesių amžiaus mergaičių kiaušidžių histologiniai preparatai.

11.2. Tiriamųjų atranka

Tiriamųjų imtį sudarė 5 mirusios 0-10 mėnesių amžiaus mergaitės: naujagimė (0 mėn.), 1,5 mėn., 5,5 mėn., 9 mėn. ir 10 mėn. amžiaus.

Ištirti kiaušidžių histologiniai preparatai.

11.3. Tyrimo organizavimas ir metodai

Gavus LSMU BEC (Bioetikos centro) leidimą, buvo tiriami penkių 0 - 10 mėnesių amžiaus mergaičių kiaušidžių histologiniai preparatai. Kiaušidės buvo gautos iš Valstybinės teismo medicinos tarnybos Kauno skyriaus. Kiaušidės buvo paimtos praėjus daugiau kaip 12 val. po mergaitės mirties. Preparatai pagaminti LSMU Histologijos ir embriologijos katedros laboratorijoje.

11.3.1. Histologinės medžiagos fiksavimas

Medžiaga fiksuota 10% formalino tirpale daugiau nei 24 val.

11.3.2. Histologinės medžiagos paruošimas pjautymui

Fiksuoti kiaušidžių gabaliukai 12 val. plauti tekančiu vandeniu. Histologinės medžiagos dehidracija atlikta didėjančios koncentracijos etanolio.

11.3.3. Užliejimas parafinu

Prieš pjaustant mikrotomu, fiksuoti kiaušidžių gabaliukai užlieti parafinu ir dėti į paruoštas formeles. Papildomai užpilta ištirpintu parafinu, uždėtas plastikinis blokelių laikiklis ir palikta, kad sustingtų. Iš formelės išimtas suketėjęs parafino blokelis su laikikliu. Blokelių kraštai skalpeliu nulyginti taip, kad liktų 2 mm parafino sluoksnis iš visų kiaušidės gabaliukų pusių.

11.3.4. Histologinės medžiagos pjaustymas

Atliktos 5 µm storio nuopjovos, o tyrimui panaudota kas 30 nuopjova, kuri dėta į vonelę su 37°C vandeniu, kad išsilygintų raukšlės. Po to preparatas uždėtas ant objektinio stiklelio ir džiovintas ore.

11.3.5. Nuopjovų dažymas, uždengimas bei preparatų žymėjimas

Tam, kad būtų pašalintas parafinas, objektiniai stikleliai su nuopjovomis 5 min. panardinti į indelį su ksilolu. Po to nuopjovos rehidruotos mažėjančios koncentracijos etanolio ir galiausiai pamerktos į distiliuotą vandenį. Iš jo ištraukti objektiniai stikleliai 5 min. pamerkti į 0,5% hematoksilino tirpalą. Po to 5 min. plauti distiliuotu vandeniu ir 2 min. pamerkti į 0,1% eozino tirpalą. Tada plauti 2 min. distiliuotu vandeniu ir 5 min. pamerkti į 96° etanolį, po to - 1 min. į ksilolą. Iš ksilolo išėmus objektinį stiklį, ant nuopjovos užlašinta Kanados balzamo, uždengta dengiamuoju stikleliu ir palikta išdžiūti. Paruošti preparatai sunumeruoti plonu markeriu.

11.3.6. Histologinių preparatų tyrimas

Darytos folikulų mikrofotografijos mikroskopu Olympus BX40 (kamera Olympus XC30). Folikulų morfometriniai matavimai atlikti naudojant µManager (Micro-Manager Open Source Microscopy Software) for Windows Version 1.4 programą. Kiekvienos mergaitės kiaušidėje tirta po 10 užuomazginių folikulų. Matuotas užuomazginio folikulo skersmuo, plotas ir perimetras, pirminio oocito skersmuo, plotas ir perimetras, jo branduolio skersmuo, plotas ir perimetras, trijų folikulinių ląstelių ilgis, aukštis, plotas ir perimetras (išvesti vidurkiai), pamatinės membranos storis.

11.4. Duomenų analizės metodai

Statistinė analizė atlikta naudojant SPSS 20.0 (angl. Statistical Package for the Social Sciences) programą. Duomenys statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$. Kintamojo skirstinio normalumas tikrintas Shapiro –Wilk kriterijumi bei Kolmogorov – Smirnov testu. Visos reikšmės, pasiskirsčiusios pagal normalųjį skirstinį, nurodytos kaip vidurkis ir standartinis nuokrypis ($\bar{x} \pm SN$). Amžiaus ir morfometrinių duomenų asociacijai ir koreliacijai vertinti naudotas Pearson's R testas. Morfometrinių duomenų tarpusavio asociacijai ir koreliacijai vertinti taip pat naudotas Pearson's R testas. Morfometrinių duomenų vidurkių skirtumai vertinti taikant vienaveiksnės dispersinės analizės (ANOVA) Tukey kriterijų.

12. REZULTATAI

12.1. 0–10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų morfometrinė charakteristika

Ištyrus 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginius kiaušidžių folikulus nustatyta, kad naujagimės užuomazginių folikulų skersmuo ($4,97 \pm 0,37 \mu\text{m}$) reikšmingai mažesnis už kitų mergaičių folikulų skersmenis ($p < 0,05$). 1,5 mėn. mergaitės folikulų skersmuo buvo didžiausias ($6,73 \pm 1,09 \mu\text{m}$), 10 mėn. - šiek tiek mažesnis ($6,05 \pm 1,44 \mu\text{m}$), o 9 mėn. ir 5,5 mėn. amžiaus mergaičių - dar mažesni (atitinkamai $5,60 \pm 0,85 \mu\text{m}$ ir $5,52 \pm 0,88 \mu\text{m}$) (1 lentelė).

1 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų skersmenys

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias skersmuo, μm	Didžiausias skersmuo, μm
0	$4,97 \pm 0,37$ a	4,45	5,82
1,5	$6,73 \pm 1,09$ a1	5,26	9,02
5,5	$5,52 \pm 0,88$ a2	4,10	7,41
9	$5,60 \pm 0,85$ a3	4,01	6,70
10	$6,05 \pm 1,44$ a4	4,05	8,81
a:a1, a:a2, a:a3, a:a4, $p < 0,05$. a1:a4, a2:a3, a2:a4, a3:a4, $p > 0,05$			

Didžiausias užuomazginių kiaušidės folikulų plotas buvo 0 mėn. amžiaus ($11,28 \pm 1,27 \mu\text{m}^2$) ir 1,5 mėn. amžiaus ($11,57 \pm 1,79 \mu\text{m}^2$) mergaičių kiaušidėse. Mažiausias buvo 10 mėn. amžiaus mergaitės folikulų plotas - $10,19 \pm 0,78 \mu\text{m}^2$. Jis statistiškai patikimai skyrėsi nuo 0 ir 1,5 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių folikulų plotų ($p < 0,05$). 5,5 mėn. amžiaus mergaitės užuomazginių folikulų plotas buvo $10,21 \pm 1,71 \mu\text{m}^2$, o 9 mėn. amžiaus – $10,76 \pm 1,55 \mu\text{m}^2$ ($p > 0,05$) (2 lentelė).

2 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų plotai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm^2	Mažiausias plotas, μm^2	Didžiausias plotas, μm^2
0	$11,28 \pm 1,27$ a	9,41	13,26
1,5	$11,57 \pm 1,79$ a1	8,89	15,38
5,5	$10,21 \pm 1,71$ a2	7,91	13,99
9	$10,76 \pm 1,55$ a3	8,24	13,26
10	$10,19 \pm 0,78$ a4	9,32	11,86
a:a4, a1:a4, $p < 0,05$. a:a1:a2:a3, a2:a3:a4, $p > 0,05$.			

Tyrimo rezultatai parodė, kad 0–10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių folikulų perimetras žymiai nesiskyrė ($p>0,05$). 1,5 mėn. amžiaus mergaitės jis buvo didžiausias - $12,17\pm1,04\ \mu\text{m}$, naujagimės šiek tiek mažesnis - $12,09\pm0,63\ \mu\text{m}$, 9 mėn. amžiaus - $11,81\pm0,81\ \mu\text{m}$, 10 mėn. – $11,77\pm0,57\ \mu\text{m}$, o 5,5 mėn. mergaitės jis buvo mažiausias - $11,69\pm0,87\ \mu\text{m}$ (3 lentelė).

3 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų perimetrai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias perimetras, μm	Didžiausias perimetras, μm
0	$12,09\pm0,63$ a	11,08	13,00
1,5	$12,17\pm1,04$ a1	10,80	14,16
5,5	$11,69\pm0,87$ a2	10,41	13,62
9	$11,81\pm0,81$ a3	10,45	13,00
10	$11,77\pm0,57$ a4	11,10	12,74
a:a1:a2:a3:a4, $p>0,05$.			

4 lentelėje pavaizduota, kad 0–10 mėn. amžiaus mergaičių kiaušidžių užuomazginiuose folikuluose esančių pirminių oocitų skersmenys buvo panašūs. 1,5 mėn. amžiaus mergaitės oocitų skersmuo buvo didžiausias - $3,77\pm0,32\ \mu\text{m}$, nuo jo nežymiai skyrėsi 10 mėn. amžiaus - $3,76\pm0,32\ \mu\text{m}$, 9 mėn. amžiaus - $3,68\pm0,27\ \mu\text{m}$ ir 0 mėn. - $3,66\pm0,24\ \mu\text{m}$. 5,5 mėn. amžiaus mergaitės oocitų skersmuo buvo mažiausias - $3,58\pm0,29\ \mu\text{m}$ ($p>0,05$).

4 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų skersmenys

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias skersmuo, μm	Didžiausias skersmuo, μm
0	$3,66\pm0,24$ a	3,44	4,10
1,5	$3,77\pm0,32$ a1	3,34	4,41
5,5	$3,58\pm0,29$ a2	3,16	4,20
9	$3,68\pm0,27$ a3	3,23	4,10
10	$3,76\pm0,32$ a4	3,24	4,24
a:a1:a2:a3:a4, $p>0,05$.			

Išmatavus šios amžiaus grupės mergaičių užuomazginių kiaušidžių folikulų oocitų parametrus nustatyta, kad 1,5 mėn. amžiaus mergaitės oocitų plotas ($10,89\pm1,45\ \mu\text{m}^2$) buvo reikšmingai didesnis už 10 mėn. amžiaus mergaitės oocitų plotą ($8,79\pm1,26\ \mu\text{m}^2$) ($p<0,05$). Kito amžiaus mergaičių oocitų plotai

buvo panašūs: 0 mėn. amžiaus - $10,04 \pm 1,34 \mu\text{m}^2$, 9 mėn. amžiaus - $9,89 \pm 1,25 \mu\text{m}^2$, o 5,5 mėn. amžiaus mergaitės oocitų plotas - $9,72 \pm 1,62 \mu\text{m}^2$ ($p > 0,05$) (5 lentelė).

5 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų plotai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm^2	Mažiausias plotas, μm^2	Didžiausias plotas, μm^2
0	$10,04 \pm 1,34$ a	8,03	12,86
1,5	$10,89 \pm 1,45$ a1	8,74	13,93
5,5	$9,72 \pm 1,62$ a2	7,53	13,33
9	$9,89 \pm 1,25$ a3	7,21	11,55
10	$8,79 \pm 1,26$ a4	7,34	11,50
a1:a4, $p < 0,05$. a:a2:a3:a4, a:a1:a2:a3 $p > 0,05$.			

Visų mergaičių užuomazginiuose folikuluose esančių oocitų perimetrai buvo panašūs ($p > 0,05$). Didžiausias - 5,5 mėn. amžiaus ($12,09 \pm 0,83 \mu\text{m}$), nedaug mažesnis - 0 mėn. ($12,04 \pm 1,05 \mu\text{m}$), dar mažesni - 10 mėn. ($12,00 \pm 0,83 \mu\text{m}$) ir 1,5 mėn. ($11,88 \pm 1,76 \mu\text{m}$) amžiaus mergaičių. Mažiausias oocitų perimetras buvo nustatytas 9 mėn. amžiaus mergaitės folikuluose - $11,28 \pm 1,31 \mu\text{m}$ (6 lentelė).

6 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų perimetrai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis μm	Mažiausias perimetras, μm	Didžiausias perimetras, μm
0	$12,04 \pm 1,05$ a	11,01	14,52
1,5	$11,88 \pm 1,76$ a1	9,66	15,83
5,5	$12,09 \pm 0,83$ a2	10,96	13,07
9	$11,28 \pm 1,31$ a3	8,65	13,66
10	$12,00 \pm 0,83$ a4	9,95	13,05
a:a1:a2:a3:a4, $p > 0,05$.			

Atlikus matavimus paaiškėjo, kad šio amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų branduolių skersmenys taip pat buvo panašūs ($p > 0,05$). Didžiausias naujagimės - $1,60 \pm 0,18 \mu\text{m}$, šiek tiek mažesnis 1,5 mėn. amžiaus - $1,58 \pm 0,11 \mu\text{m}$, 9 mėn. amžiaus - $1,56 \pm 0,18 \mu\text{m}$, 10 mėn. - $1,50 \pm 0,09 \mu\text{m}$. 5,5 mėn. amžiaus mergaitės oocitų branduolių skersmuo buvo mažiausias - $1,49 \pm 0,16 \mu\text{m}$ (7 lentelė).

7 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų branduolių skersmenys

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias skersmuo, μm	Didžiausias skersmuo, μm
0	$1,60 \pm 0,18$ a	1,36	1,85
1,5	$1,58 \pm 0,11$ a1	1,40	1,74
5,5	$1,49 \pm 0,16$ a2	1,20	1,80
9	$1,56 \pm 0,18$ a3	1,37	1,85
10	$1,50 \pm 0,09$ a4	1,39	1,66
a:a1:a2:a3:a4, $p > 0,05$.			

Visų mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų branduolių plotai taip pat reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$). Didžiausias branduolių plotas buvo 0 mėn. ($1,99 \pm 0,41 \mu\text{m}^2$) ir 9 mėn. ($1,99 \pm 0,50 \mu\text{m}^2$) amžiaus mergaičių oocituose. Šiek tiek mažesnis 1,5 mėn. amžiaus mergaitės - $1,97 \pm 0,30 \mu\text{m}^2$, 10 mėn. - $1,77 \pm 0,23 \mu\text{m}^2$, mažiausias 5,5 mėn. amžiaus mergaitės - $1,75 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ (8 lentelė).

8 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų branduolių plotai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm^2	Mažiausias plotas, μm^2	Didžiausias plotas, μm^2
0	$1,99 \pm 0,41$ a	1,46	2,58
1,5	$1,97 \pm 0,30$ a1	1,55	2,41
5,5	$1,75 \pm 0,39$ a2	1,09	2,59
9	$1,99 \pm 0,50$ a3	1,49	2,74
10	$1,77 \pm 0,23$ a4	1,47	2,11
a:a1:a2:a3:a4, $p > 0,05$.			

Atlikus 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų branduolių matavimus nustatyta, kad šioje amžiaus grupėje mergaičių oocitų branduolių perimetras taip pat ženkliai nesiskiria ($p > 0,05$). 0 mėn. bei 9 mėn. amžiaus mergaičių oocitų branduolių perimetrai buvo labai panašūs (atitinkamai $5,20 \pm 0,65 \mu\text{m}$ ir $5,19 \pm 0,64 \mu\text{m}$). 1,5 mėn. ($5,11 \pm 0,36 \mu\text{m}$), 10 mėn. ($4,99 \pm 0,40 \mu\text{m}$) bei 5,5 mėn. ($4,96 \pm 0,77 \mu\text{m}$) amžiaus mergaičių rezultatai taip pat žymiai nesiskyrė (9 lentelė).

9 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų branduolių perimetrai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias perimetras, μm	Didžiausias perimetras, μm
0	$5,20 \pm 0,65$ a	4,36	6,17
1,5	$5,11 \pm 0,36$ a1	4,63	5,60
5,5	$4,96 \pm 0,77$ a2	3,85	6,38
9	$5,19 \pm 0,64$ a3	4,47	6,17
10	$4,99 \pm 0,40$ a4	4,46	5,61
a:a1:a2:a3:a4, $p > 0,05$.			

Atlikus šio amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių matavimus rasta, kad folikulinių ląstelių aukštis reikšmingai nesiskiria ($p > 0,05$). Didžiausias aukštis 1,5 mėn. amžiaus - $0,32 \pm 0,03$ μm , mažiausias 5,5 mėn. amžiaus mergaitės - $0,28 \pm 0,02$ μm , naujagimės - $0,29 \pm 0,03$ μm , 9 mėn. amžiaus - $0,30 \pm 0,04$ μm , o 10 mėn. - $0,30 \pm 0,03$ μm (10 lentelė).

10 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių aukščiai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias aukštis, μm	Didžiausias aukštis, μm
0	$0,29 \pm 0,03$ a	0,25	0,34
1,5	$0,32 \pm 0,03$ a1	0,28	0,34
5,5	$0,28 \pm 0,02$ a2	0,25	0,30
9	$0,30 \pm 0,04$ a3	0,26	0,36
10	$0,30 \pm 0,03$ a4	0,24	0,35
a:a1:a2:a3:a4, $p > 0,05$.			

Išmatavus visų šių mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių ilgius nustatyta, kad 9 mėn. amžiaus mergaitės rezultatas ($0,77 \pm 0,08$ μm) reikšmingai didesnis už kitų mergaičių ($p < 0,05$). Tarp kito amžiaus mergaičių folikulinių ląstelių ilgių reikšmingo skirtumo nėra ($p > 0,05$). 5,5 mėn. mergaitės folikulinių ląstelių ilgis mažiausias - $0,53 \pm 0,03$ μm , 10 mėn. - $0,55 \pm 0,03$ μm , 1,5 mėn. mergaitės $0,59 \pm 0,03$ μm , o naujagimės - $0,59 \pm 0,02$ μm (11 lentelė).

11 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių ilgiai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias ilgis, μm	Didžiausias ilgis, μm
0	$0,59 \pm 0,02$ a	0,55	0,61
1,5	$0,59 \pm 0,03$ a1	0,52	0,62
5,5	$0,53 \pm 0,03$ a2	0,48	0,59
9	$0,77 \pm 0,08$ a3	0,66	0,87
10	$0,55 \pm 0,03$ a4	0,50	0,60
a3:a, a3:a1, a3:a2; a3:a4, $p < 0,05$. a:a1:a2:a4, $p > 0,05$			

12 lentelėje pateikti šių mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių plotai, kurie tarpusavyje skyrėsi nežymiai ($p > 0,05$). 5,5 mėn. ir 10 mėn. amžiaus mergaičių jie buvo vienodi ir mažiausi ($0,17 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$), 0 mėn. ir 1,5 mėn. amžiaus – taip pat labai panašūs (atitinkamai $0,20 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ ir $0,20 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$), o 9 mėn. - $0,19 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$.

12 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių plotai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm^2	Mažiausias plotas, μm^2	Didžiausias plotas, μm^2
0	$0,20 \pm 0,02$ a	0,17	0,23
1,5	$0,20 \pm 0,03$ a1	0,14	0,25
5,5	$0,17 \pm 0,01$ a2	0,16	0,64
9	$0,19 \pm 0,04$ a3	0,15	0,25
10	$0,17 \pm 0,01$ a4	0,16	0,19
a:a1:a2:a3:a4, $p > 0,05$.			

Atlikus 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių morfometrinius matavimus nustatyta, kad naujagimės folikulinių ląstelių perimetras ($2,31 \pm 0,15 \mu\text{m}$) buvo reikšmingai didesnis už 5,5 mėn. ($2,02 \pm 0,11 \mu\text{m}$) ir 9 mėn. ($2,05 \pm 0,27 \mu\text{m}$) amžiaus mergaičių ($p < 0,05$). Kitų mergaičių folikulinių ląstelių perimetrai tarpusavyje skyrėsi mažiau ($p > 0,05$). 1,5 mėn. amžiaus – $2,18 \pm 0,17 \mu\text{m}$, o 10 mėn. amžiaus - $2,10 \pm 0,14 \mu\text{m}$ (13 lentelė).

13 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų folikulinių ląstelių perimetrai

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias perimetras, μm	Didžiausias perimetras, μm
0	2,31 $\pm$ 0,15 a	2,15	2,49
1,5	2,18 $\pm$ 0,17 a1	1,95	2,43
5,5	2,02 $\pm$ 0,11 a2	1,89	2,23
9	2,05 $\pm$ 0,27 a3	1,71	2,54
10	2,10 $\pm$ 0,14 a4	1,91	2,39
a:a2, a:a3, p<0,05, a:a1:a4, a1:a2:a3:a4 p>0,05.			

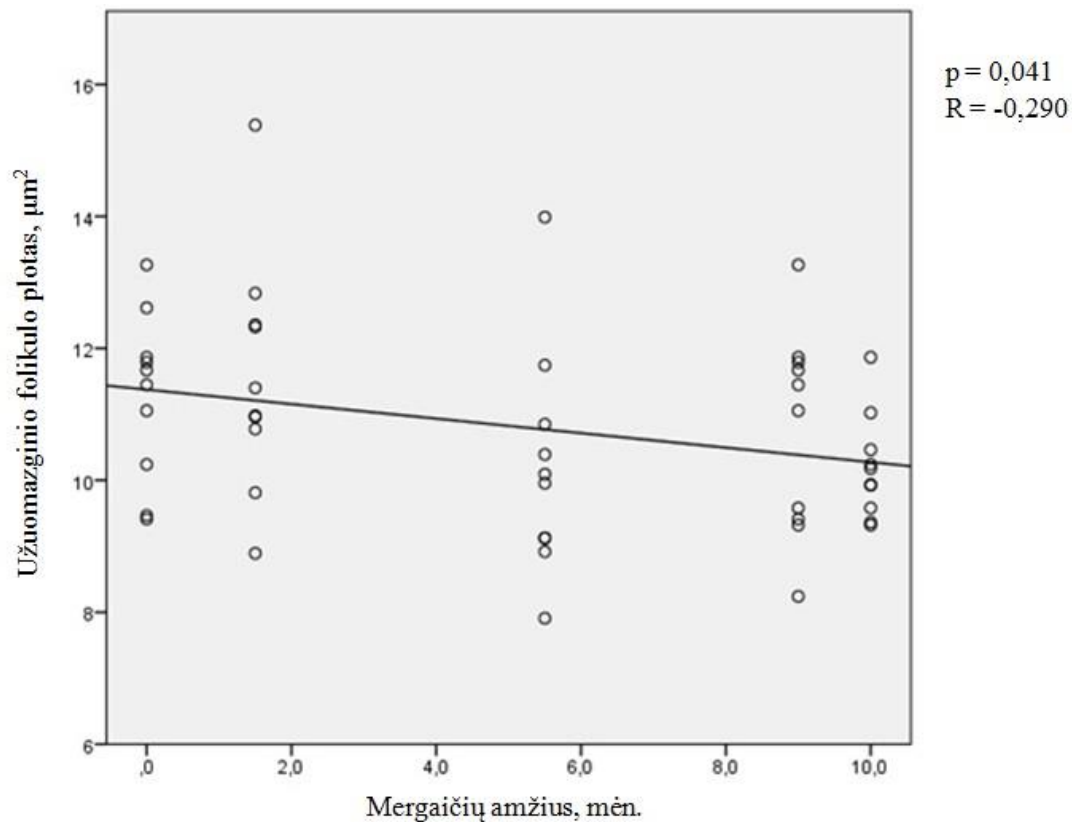
Atlikus šių mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų pamatinės membranos storio matavimus gauti rezultatai rodo, kad 9 mėn. (0,08 $\pm$ 0,01 μm) ir 10 mėn. (0,09 $\pm$ 0,01 μm) amžiaus mergaičių folikulų pamatinės membranos reikšmingai storesnės nei kitų mergaičių (p<0,05). Kito amžiaus mergaičių pamatinių membranų storiai buvo labai panašūs (p>0,05): 1,5 mėn. ir 5,5 mėn. amžiaus mergaičių rezultatai gauti vienodi (0,06 $\pm$ 0,01 μm), o naujagimės pamatinės membranos storis mažiausias - 0,05 $\pm$ 0,01 μm (14 lentelė).

14 lentelė. 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų pamatinės membranos storis

Amžius, mėn.	Vidurkis ir standartinis nuokrypis, μm	Mažiausias storis, μm	Didžiausias storis, μm
0	0,05 $\pm$ 0,01 a	0,04	0,06
1,5	0,06 $\pm$ 0,01 a1	0,05	0,06
5,5	0,06 $\pm$ 0,01 a2	0,04	0,07
9	0,08 $\pm$ 0,01 a3	0,06	0,09
10	0,09 $\pm$ 0,01 a4	0,07	0,11
a3:a, a3:a1, a3:a2, a4:a, a4:a1, a4:a2, p<0,05. a:a1:a2, a3:a4 p>0,05.			

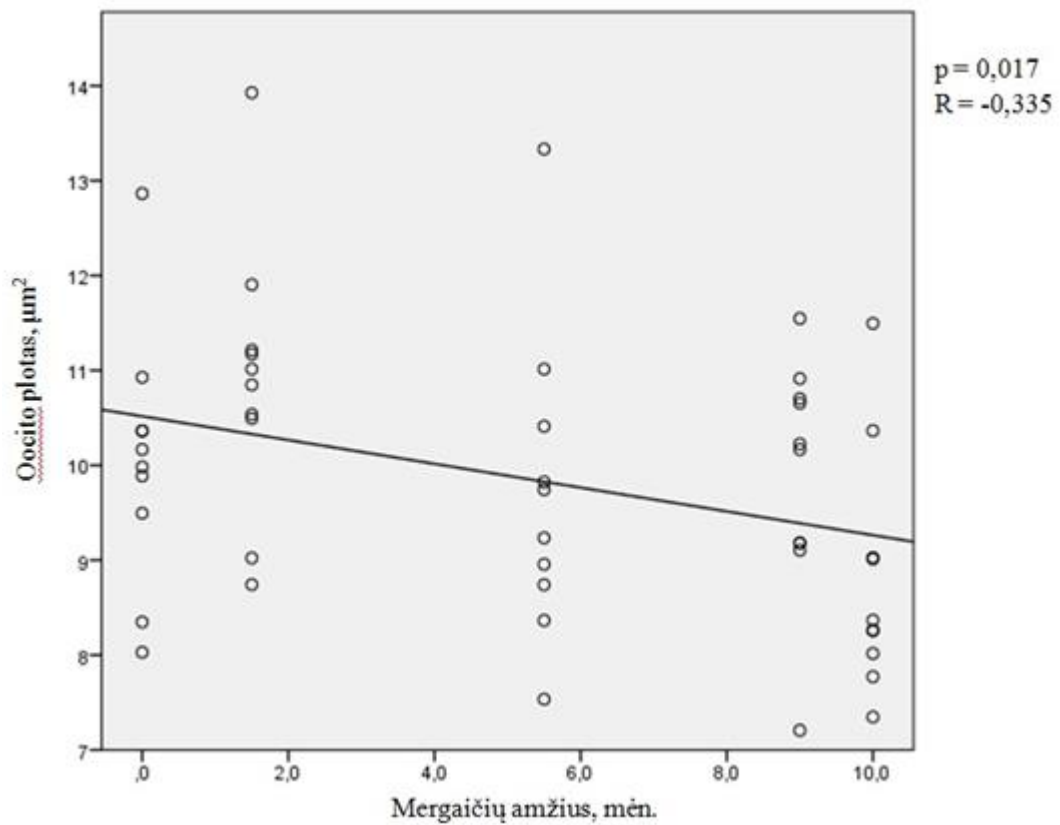
12.2. 0–10 mėn. amžiaus mergaičių bei užuomazginių kiaušidės folikulų morfometrinių duomenų tarpusavio ryšys

Atlikus 0–10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų morfometrinius matavimus, nustatyta statistiškai reikšminga neigiama koreliacija tarp amžiaus ir užuomazginio folikulo ploto ($p < 0,05$, $R = -0,290$). Tai reiškia, kad didėjant mergaitės amžiui, folikulo plotas mažėjo (5 pav.).



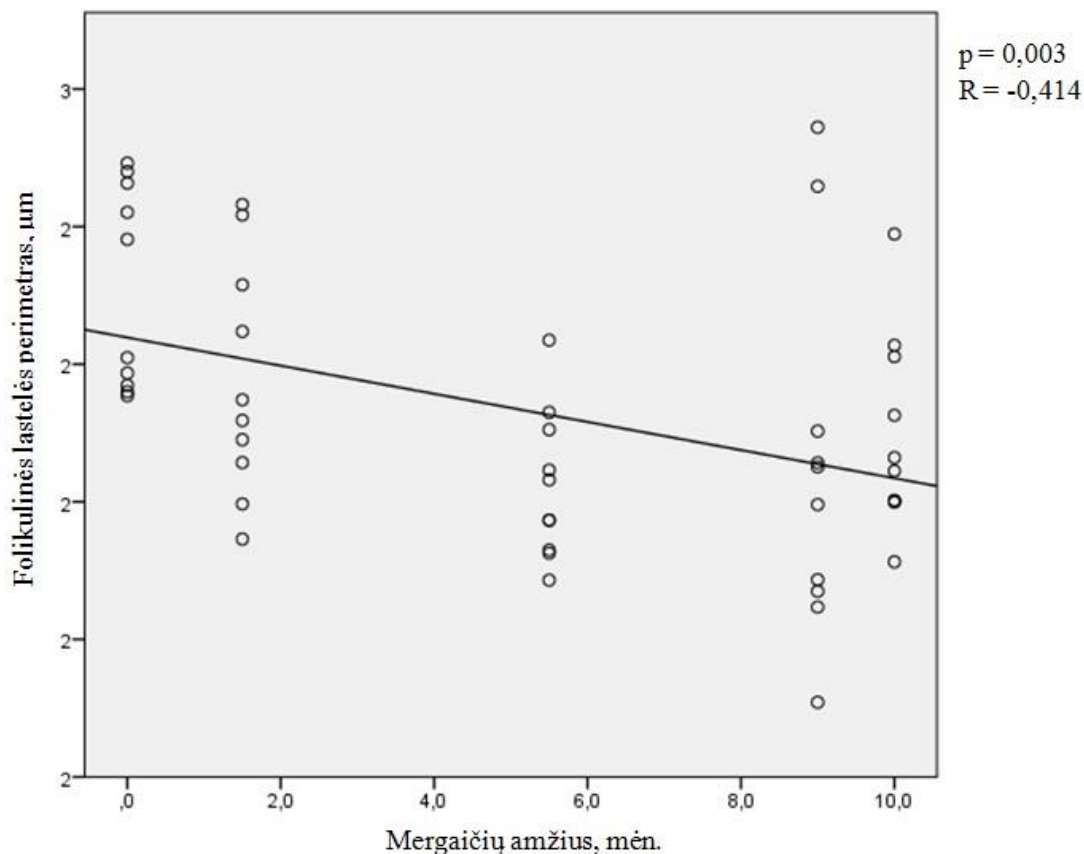
5 pav. 0-10 mėn amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų plotų ir amžiaus koreliacija

Išanalizavus gautus tyrimo duomenis, nustatytas reikšmingas neigiamas ryšys tarp amžiaus ir oocito ploto ($p < 0,05$, $R = -0,335$) – didėjant mergaičių amžiui, oocitų plotas mažėjo (6 pav.).



6 pav. 0-10 mėn amžiaus mergaičių pirminių oocitų plotų ir amžiaus koreliacija

Nustatyta reikšminga neigiama koreliacija tarp mergaičių amžiaus bei folikulinių ląstelių perimetro ($p < 0,05$, $R = -0.414$). Tai reiškia, kad didėjant mergaitės amžiui, folikulinių ląstelių perimetras mažėjo (7 pav.).



7 pav. 0-10 mėn amžiaus mergaičių folikulinų ląstelių perimetro ir amžiaus koreliacija

12.3. 0–10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų morfometrinių duomenų tarpusavio ryšys

Gautas statistškai reikšmingas teigiamas ryšys tarp užuomazginio folikulo ploto ir pirminio oocito ploto ($p < 0,05$, $R = 0,921$).

Tyrimo metu buvo nustatyta statistškai reikšminga teigiama koreliacija tarp folikulo skersmens ir pirminio oocito skersmens ($p < 0,05$, $R = 0,289$).

Atlikus statistinę analizę paaiškėjo, kad pirminio oocito branduolio plotas reikšmingai teigiamai koreliuoja su folikulinų ląstelių plotu ($p < 0,05$, $R = 0,288$).

Tyrimo metu rastas patikimas neigiamas ryšys tarp užuomazginio folikulo skersmens ir pamatinės membranos storio ($p < 0,05$, $R = -0,374$).

Taip pat užuomazginio folikulo perimetras statistškai reikšmingai teigiamai koreliuoja su oocito perimetru ($p < 0,05$, $R = 0,591$).

Be to, pirminio oocito skersmuo teigiamai koreliuoja su folikulinų ląstelių aukščiu ($p < 0,05$, $R = 0,319$).

13. REZULTATŲ APTARIMAS

Skirtingi autoriai pateikia skirtingą moters kiaušidės folikulų klasifikaciją. S. Lintern-Moore su bendraautoriais (1974) mergaičių iki 9 metų amžiaus kiaušidžių folikulus suskirstė į 8 klases [23]:

1. A klasė – mejozės profazėje esantys oocitai be folikulinių ląstelių. Randami vaisiaus kiaušidėse;
2. B klasė – folikulai, turintys vieną plokščiųjų folikulinių ląstelių sluoksnį;
3. B/C klasė – oocitai apsupti vienu plokščiųjų ir kubinių folikulinių ląstelių sluoksniu;
4. C klasė – folikulai, turintys vieną kubinių folikulinių ląstelių sluoksnį;
5. D1 klasė – folikulai, turintys 2–7 folikulinių ląstelių sluoksnius, aplink oocitą matoma skaidrioji zona;
6. D2 klasė – folikulai, tarp grūdėtųjų folikulinių ląstelių turintys ertmių su folikuliniu skysčiu, grūdėtųjų folikulinių ląstelių citoplazmoje yra „Call-Exner“ vakuolių;
7. E klasė – folikulai, turintys pusmėnulio formos ertmę, gerai vaskuliarizuotą folikulo apvalkalėlį;
8. F klasė – folikulai, turintys didelę skysčio užpildytą ertmę, o oocitas apsuptas spinduliniu vainiku.

D.A. Gook, ir bendraautoriai (2008) reprodukcinio amžiaus (14-40 m.) merginų ir moterų kiaušidės folikulus suklasifikavo į 6 grupes [2]:

1. Užuomazginiai folikulai – oocitą supa vienas plokščiųjų folikulinių ląstelių sluoksnis;
2. Tarpiniai folikulai – oocitą supa vienas plokščiųjų ir kubinių folikulinių ląstelių sluoksnis;
3. Pirminiai folikulai – oocitą supa vienas kubinių folikulinių ląstelių sluoksnis;
4. Proliferuojantys pirminiai folikulai – folikulas, kuriame formuojasi antras folikulinių ląstelių sluoksnis;
5. Antriniai folikulai – oocitą supa 2-6 ir daugiau pilnai susiformavusių grūdėtųjų folikulinių ląstelių sluoksnių, tačiau ertmių nėra;
6. Ertminiai folikulai - subrendę folikulai, kurie turi daugelį grūdėtųjų folikulinių ląstelių sluoksnių ir ertmę, pripildytą folikulinio skysčio.

G.F. Erickson (2008) pateikė dar kitokią moters kiaušidės folikulų klasifikaciją. Jis folikulus suskirstė į priešertminius (užuomazginiai, pirminiai, antriniai - 1 klasė), tretinius (2 klasė) ir ertminius (Grafo: maži (3, 4 ir 5 klasės), vidutiniai (6 klasė), dideli (7 klasė) ir priešovuliaciniai (8 klasė)) [24].

Kadangi nėra vieningos moters kiaušidės folikulų klasifikacijos, tyrimo metu 0-10 mėn. amžiaus mergaičių kiaušidėse aptiktus mažiausius folikulus atrinkome remdamiesi literatūros duomenimis pagal naujesnę ir paprastesnę D.A. Gook ir bendraautorių 2008 m. pateiktą klasifikaciją ir priskyrėme

užuomazginių grupėi. Kitų grupių folikulų nepavyko įtraukti į tyrimą, nes 0–10 mėn. amžiaus mergaičių kiaušidėse jų nebuvo arba buvo nepakankamas kiekis statistinei grupei sudaryti. Dėl šios priežasties kitų grupių folikulų statistinė analizė nebūtų buvusi patikima ir tiksli.

Mums prieinamoje užsienio ir Lietuvos literatūroje yra labai mažai duomenų apie 0–10 mėn. amžiaus mergaičių kiaušidžių folikulų ir juose esančių oocitų morfometriją.

Išmatavus 5 mergaičių (nuo 0 iki 10 mėnesių amžiaus) kiaušidžių užuomazginių folikulų skersmenį, buvo gauti duomenys: mažiausias skersmuo 4,45 μm , didžiausias - 9,02 μm . Užuomazginių folikulų oocitų mažiausias skersmuo - 3,16 μm , didžiausias - 4,41 μm . Mūsų gauti rezultatai sutampa su S. Lintern-Moore ir bendraautorių (1974) tyrime pateiktais duomenimis ir rodo folikulų augimą. Šie mokslininkai nagrinėjo mergaičių kiaušidžių folikulų vystymąsi nuo gimimo iki 9-erių metų amžiaus. Tyrimo metu jie nustatė, kad mergaičių iki 9-erių metų amžiaus kiaušidėse užuomazginiai folikulai buvo iki 25 μm skersmens, o šių folikulų oocitai - iki 12 μm skersmens [23].

Griffin J. su bendraautoriais (2006) savo tyrime nustatė, kad 23–45 metų moterų kiaušidžių užuomazginių folikulų skersmuo - apie 49 μm , o juose esančių oocitų skersmuo - apie 36 μm [25].

C.G. Westergaard ir kt. (2007) savo tyrime nagrinėjo 4–39 metų amžiaus mergaičių ir moterų kiaušidžių folikulus. Tyrimo metu nustatyta, jog užuomazginis folikulas yra toks, kurios oocito branduolio skersmuo <19 μm [4]. Mūsų tyrimo metu gauta, kad 0-10 mėn. amžiaus mergaičių užuomazginių kiaušidės folikulų oocitų branduolių skersmuo svyravo nuo 1,20 μm iki 1,85 μm .

Šie autoriai išmatavo užuomazginių folikulų, oocitų ir jų branduolių skersmenis iki 13-os metų amžiaus mergaičių kiaušidėse. Jie nustatė, jog užuomazginių folikulų skersmuo buvo $39,0 \pm 0,4$ μm , juose esančių pirminių oocitų skersmuo – $34,3 \pm 0,4$ μm , o oocitų branduolių skersmuo – $17,8 \pm 0,2$ μm [4]. Šie rezultatai žymiai skyrėsi nuo mūsų gautųjų. Savo darbe nustatėme, kad užuomazginių folikulų skersmuo užėmė nuo $4,97 \pm 0,37$ μm iki $6,73 \pm 1,09$ μm . Juose esančių pirminių oocitų skersmuo buvo $3,58 \pm 0,29$ μm – $3,77 \pm 0,32$ μm , oocitų branduolių skersmuo nuo $1,49 \pm 0,16$ μm iki $1,60 \pm 0,18$ μm .

Westergaard ir bendraautoriai (2007) pateikia, jog užuomazginio folikulo pirminį oocitą supa apie 13 plokščių folikulinių ląstelių. Taip pat šiame tyrime buvo nustatyta, kad oocito branduolio skersmuo teigiamai koreliuoja su oocito bei folikulo skersmeniu [4]. Mūsų tyrimo metu nebuvo įmanoma suskaičiuoti, kiek folikulinių ląstelių kiekviename matuotame užuomazginiame folikule supa pirminį oocitą. Taip pat mūsų tyrimo metu reikšmingos koreliacijos tarp oocito bei folikulo skersmenų ir oocito branduolio skersmens nebuvo nustatyta. Mes savo tyrime atradome statistiškai reikšmingą koreliaciją tarp folikulo skersmens ir oocito skersmens.

Apžvelgus literatūros duomenis ir palyginus su mūsų gautaisiais galima teigti, kad tiek užuomazginiai kiaušidės folikulai, tiek juose esantys pirminiai oocitai bei jų branduoliai ir folikulinės ląstelės didėja, kartu didėjant mergaitės, o vėliau – ir moters amžiui.

Pasaulio mokslininkai labiausiai nagrinėja morfometrinius, morfologinius bei ultrastruktūrinius ovuliuotų (antrinių) oocitų parametrus. Mažai kreipiama dėmesio į kiaušidės folikulų ir juose esančių oocitų morfologinius ir morfometrinius parametrus, kadangi tiriamosios medžiagos – moterų, o ypač mažų mergaičių kiaušidžių – gauti moksliniams darbams yra pakankamai sudėtinga. Todėl mūsų atliktas tyrimas yra unikalus.

14. IŠVADOS

1. Atlikus užuomazginių folikulų morfometrinę analizę nustatyta, kad užuomazginių folikulų skersmenų vidurkis svyravo nuo $4,97 \pm 0,37 \mu\text{m}$ iki $6,05 \pm 1,44 \mu\text{m}$, plotų vidurkis - nuo $10,19 \pm 0,78 \mu\text{m}^2$ iki $11,57 \pm 1,79 \mu\text{m}^2$, perimetrų vidurkis - nuo $11,69 \pm 0,87 \mu\text{m}$ iki $12,17 \pm 1,04 \mu\text{m}$.

Pirminių oocitų skersmenų vidurkis buvo nuo $3,58 \pm 0,29 \mu\text{m}$ iki $3,77 \pm 0,32 \mu\text{m}$, plotų vidurkis - nuo $8,79 \pm 1,26 \mu\text{m}^2$ iki $10,89 \pm 1,45 \mu\text{m}^2$, perimetrų vidurkis - nuo $11,28 \pm 1,31 \mu\text{m}$ iki $12,09 \pm 0,83 \mu\text{m}$.

Oocitų branduolių skersmenų vidurkis svyravo nuo $1,49 \pm 0,16 \mu\text{m}$ iki $1,60 \pm 0,18 \mu\text{m}$, plotų vidurkis - nuo $1,75 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ iki $1,99 \pm 0,50 \mu\text{m}^2$, perimetrų vidurkis - nuo $4,96 \pm 0,77 \mu\text{m}$ iki $5,20 \pm 0,65 \mu\text{m}$.

Folikulinių ląstelių aukščių vidurkis buvo nuo $0,28 \pm 0,02 \mu\text{m}$ iki $0,32 \pm 0,03 \mu\text{m}$, ilgių vidurkis - nuo $0,53 \pm 0,03 \mu\text{m}$ iki $0,77 \pm 0,08 \mu\text{m}$, plotų vidurkis - nuo $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ iki $0,20 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$, perimetrų vidurkis - nuo $2,02 \pm 0,11 \mu\text{m}$ iki $2,31 \pm 0,15 \mu\text{m}$.

2. Didžiausia neigiama koreliacija nustatyta tarp mergaitės amžiaus ir folikulinės ląstelės perimetro. Taip pat nustatytos reikšmingos neigiamos koreliacijos tarp mergaitės amžiaus ir užuomazginio folikulo ploto, oocito ploto.

3. Nustatytas statistiškai patikimas ryšys tarp užuomazginio folikulo ploto ir pirminio oocito ploto; užuomazginio folikulo skersmens ir pirminio oocito skersmens; oocito branduolio ploto ir folikulinių ląstelių ploto; užuomazginio folikulo skersmens ir pamatinės membranos storio; oocito skersmens ir folikulinių ląstelių aukščio.

15. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Grondahl ML, Borup R, Vikesa J, Ernst E, Andersen CY, Lykke-Hartmann K. The dormant and the fully competent oocyte: comparing the transcriptome of human oocytes from primordial follicles and in metaphase II. *Mol Hum Reprod*. 2013 Sep;19(9):600-17.
2. Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic JM. Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum Reprod*. 2008 Feb;23(2):394-402.
3. Forabosco A, Chiarella Sforza C. Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Reprod. Endocrinol*. 2007 Sept;88:675-83.
4. Westergaard CG, Byskov AG, Andersen CY. Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Hum Reprod*. 2007 Aug;22(8):2225–31.
5. Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update*. 2008 Jan;14(2):132-42.
6. Wilkosz P, Greggains GD, Tanbo TG, Fedorczak P. Female Reproductive Decline Is Determined by Remaining Ovarian Reserve and Age. *PLoS One*. 2014 Oct;9(10):1-7.
7. Gougeon A, Chainy GBN. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fert*. 1987 Nov;81:433-42.
8. McLaughlin EA, McIver SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle Development. *Reproduction*. 2009 Jan;137:1–11.
9. Lasienė K, Vitkus A, Valančiūtė A, Lasys V. Oocitų kokybės morfologiniai požymiai. *Medicina (Kaunas)* 2009 Jul;45(7):506-15.
10. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update*. 2009 May;15(5):573-85.
11. Motta PM., Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update*. 1997 May;3(3):281-95.
12. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod*. 2010 Oct;25(12):2944-54.
13. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocr Rev*. 2009 Aug;30:465–93.
14. Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, Haaften M, Looman CWN, et al. Ultrastructure of the Resting Ovarian Follicle Pool in Healthy Young Women. *Biol Reprod*. 2002 Apr;66:1151-60.

15. Knowlton NS, Craig LB, Zavy MT, Hansen KR. Validation of the power model of ovarian non-growing follicle depletion associated with aging. *Fertil Steril*. 2013 Oct;101:851–6.
16. Lobo RA. Early ovarian ageing: a hypothesis: What is early ovarian ageing? *Hum Reprod*. 2003 Sep;18(9):1762-64.
17. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod*. 2008 Mar;23(3):699-708.
18. Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update*. 2013 Jan;19(1):67-83.
19. Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, Haaften M, Looman CWN, et al. Age-Related Changes in the Ultrastructure of the Resting Follicle Pool in Human Ovaries. *Biol Reprod*. 2004 Feb;70:419-24.
20. Charlier C, Montfort J, Chabrol O, Brisard D, Nguyen T, Moreews F, et al. Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution. *BMC Genomics*. 2012 Oct;13:560-78.
21. Adhikari D, Flohr G, Gorre1 N, Shen1 Y, Yang H1, Lundin E, et al. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Mol Hum Reprod*. 2009 Dec;15(12):765.
22. Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet*. 2010 Feb;19(3):397-410.
23. Lintern-Moore S., Peters H., Moore G.P.M., Faber M. Follicular development in the infant human ovary. *J. Reprod. Fert*. 1974 Nov;39:53-64.
24. Erickson GF. Follicle Growth and Development. *Glob Libr Women's Med* [Internet]. 2008.
25. 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 Mar;3:2.