

OVOGENEES
ehk
OOGENEES

ÕPPEMATERJALID

“BIOLOOGIA PRAKTIKUM I” R. Masso, A. Saag, M. Masso

MOODLE / Õppeaine BIOLOOGIA / Arengubioloogia praktikumid / Bioloogia PRAKTIKUM I

❑ ANIMATSIOONID: <https://lepo.it.da.ut.ee/~dyyna/> Ovogenees Ovulatsioon

Online course in embryology for medicine students

developed by the universities of Fribourg, Lausanne and Bern.

Oogenesis <http://embryology.ch/en/embryogenese/gametogenesis/oogenesis/>

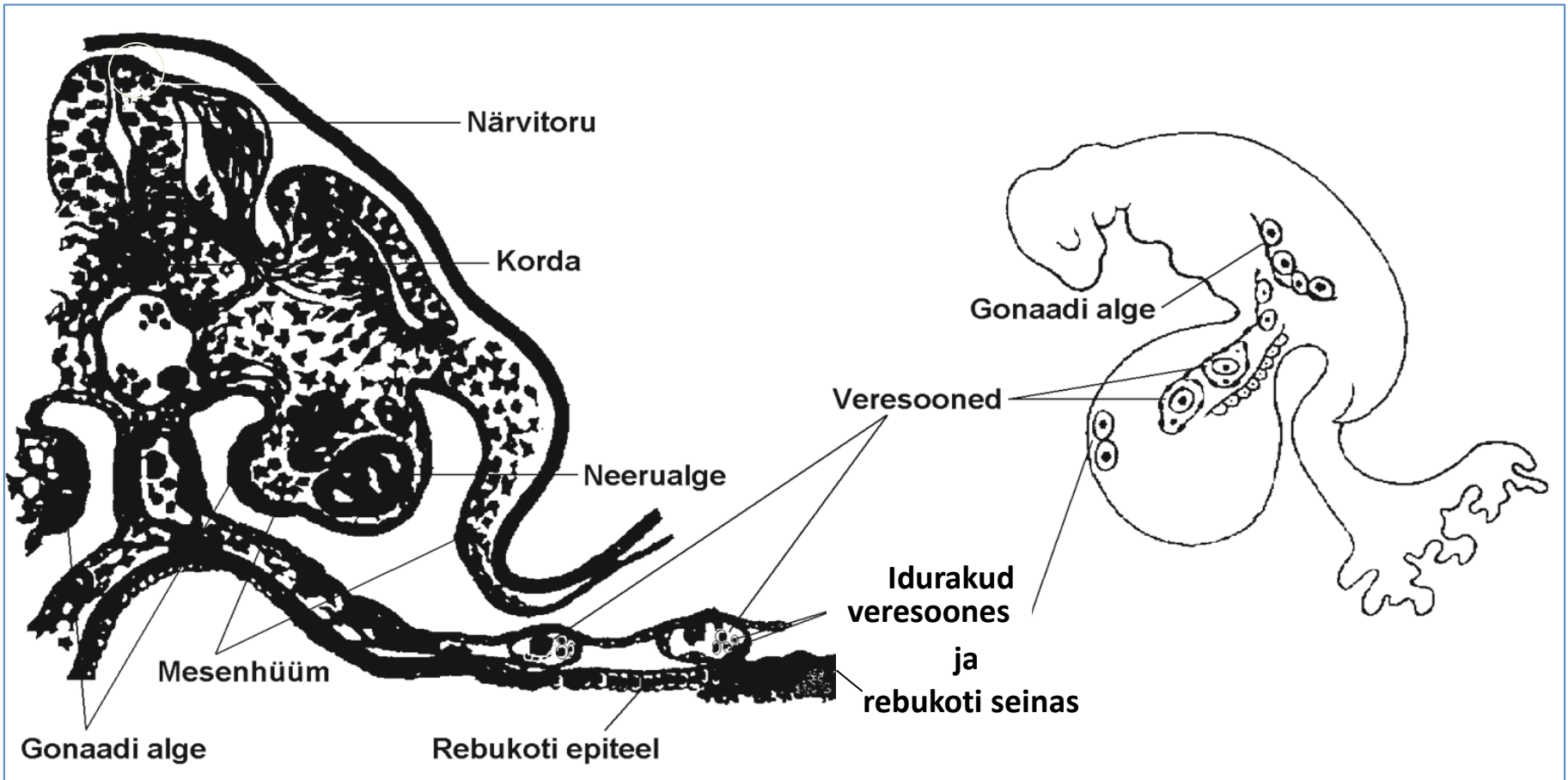
Naiste viljatus ja ART (abistav reproduktsioonitehnoloogia). Infoleht

https://www.infomaterjalid.ee/content/dam/web/healthcare/biopharma/estonia/pdfs/Naiste%20viljatus_EST.pdf

Pildimaterjali praktiliste tööde juurde - *UWMS Histology Atlas (With Thumbnail Images)*

<http://lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20WISCONSIN/www.medsch.wisc.edu/anatomy/histo/htm/ttoc.htm>

Inimese primordiaalsed sugurakud ehk **idurakud** **eristuvad epiblastis 2. arengunädalal**; rändavad 3. arengunädalal loote abiorgani rebukoti seina; liiguvad 4.-6. arengunädalal edasi genitaalvalli kus moodustavad gonaadi alge.



2013 Medrano JV et al. *Germ Cell Differentiation from Pluripotent Cells.*

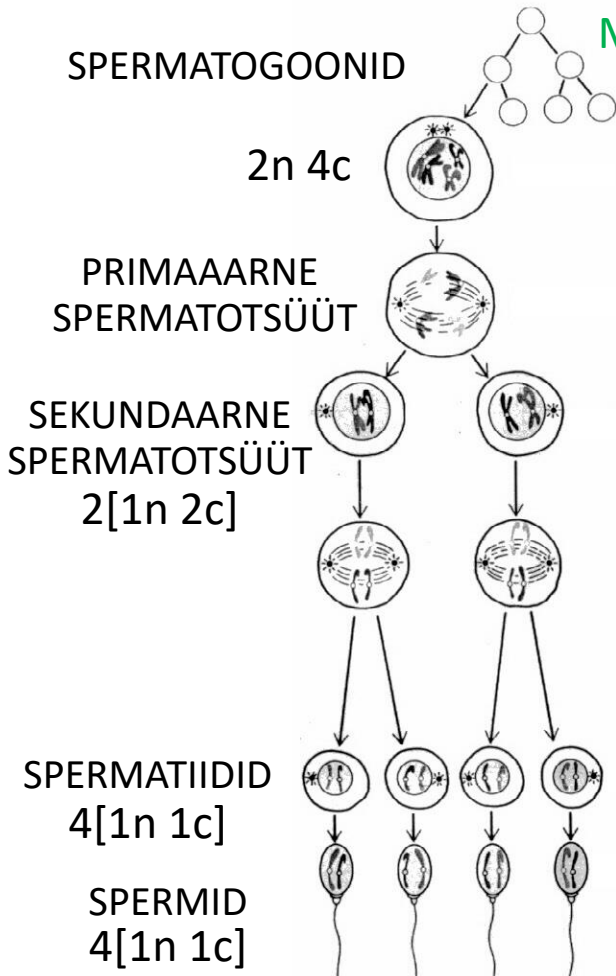
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329632>

Meioos loomses organismis

SPERMATOGENEES

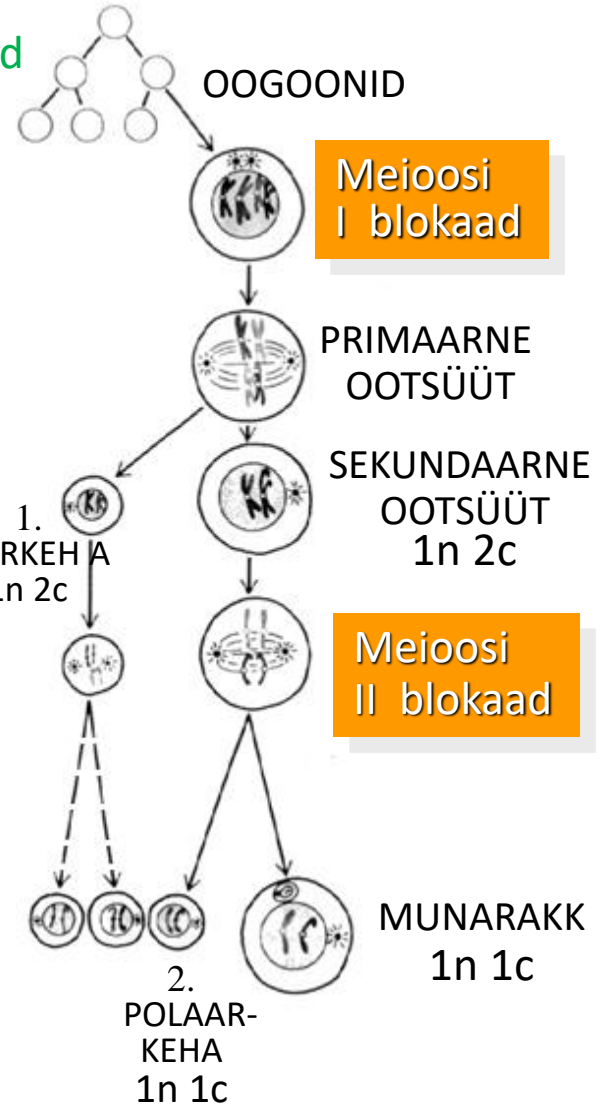
OVOGENEES ehk OOGENEES

Mitootiliselt jagunevad eellasrakud



Meioos I

Meioos II



Munaraku ARENG

Munaraku arenemisperioodid jaotatakse üldiselt kolmeks:

1 – **paljunemine** -

oogoonide mitootiline jagunemine kuni 5. prenataalne elukuu.

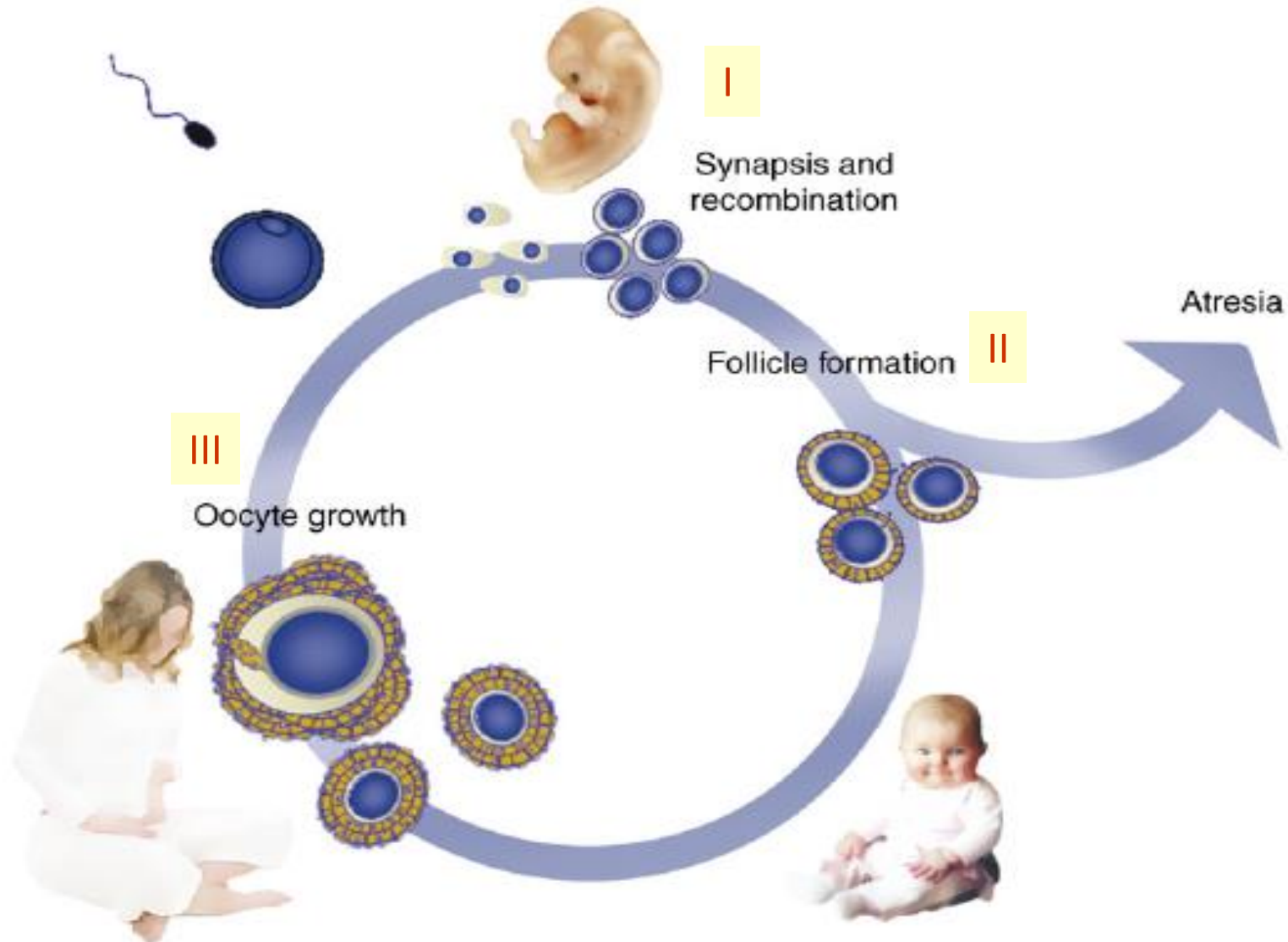
2 – **kasvamine** -

al puberteedist sisenevad ootsüüdid gruppidena (~10 tk) kasvuperioodi. Tavaliselt ainult üks neist – see, mis on domineeriva folliikuli koosseisus – areneb valmiduseni siseneda küpsemisperioodi.

3 – **küpsemine** -

ootsüüdi **meiootilised jagunemised**, mis toimuvad vahetult enne ovulatsiooni ning pärast viljastumist; vastavalt I profaas kuni II metafafaas ning II metafafaas kuni meioosi lõpp.

Tundlikud perioodid oogeneesis



Meioosi I profaas on meioosi kõige tundlikum periood!

Tekib suurel hulgal vigu, mille tulemusena hävib suur hulk tulevase sugurakke, vastavalt kas spermato- või ootsüüte.

Oogeneesi I profaas kestab 10-50 aastat, spermatogeneesis 21 päeva.

Oogeneesis rekombinatsioon ~1,6 x rohkem kui spermatogeneesis.

Oogeneesi meioosil tekib vigu ~10 x sagedamini kui spermatogeneesis.

I profaasi vead oogeneesis (vigane krossingover → kiasmide vigadega teke või mittetekkimine homoloogiliste komosoomide vahel) põhjustavad vigu

I metafaasil ja kuna just oogeneesi ajal on SAC-kontrollpunkti töö ebaefektiivsem, kui spermatogeneesi ajal ja halveneb veelgi ema vanuse kasvades – siis seetõttu võivad järgneda kromosoomide lahknemishäireid anafaasides.

Ootsüüdi I profaasi vead ongi peamiseks genoommutatsioonide allikaks – annavad aluse/võimaluse **ANEUPLOIDSETE** ootsüütide ja seeläbi **aneuploidsete sügootide** tekkeks

ANEUPLOIDIA esineb 1-2% spermatoosoididest, 20-30% ootsüütidest ning 25-35% kõigist moodustunud sügootidest.

SAC ehk **käävisüsteemi kontrollpunkt** (*spindle assembly checkpoint*)

kontrollib metafaaside ajal **kääviniitide kinnitumist kromosoomide kinetohooridele** ja **kromosoomide joondumist**.

SAC-kontrollpunkt on efektiivne spermatogeneesis, samas aga oogeneesis laseb kergesti läbi kromosoomide mittekinnitumisi ja/või joondumisi.

SAC-kontrollpunkti efektiivsus väheneb vanuse kasvades, eriti oogeneesis.

SAC-kontrollpunkti töö häirumine ongi peamine põhjus **ANEUPLOIDSETE** e **kromosoomide vale arvuga** gameetide, järgnevalt sügootide tekkeks.

Raseduse katkemise / loote surma, peamiseks põhjuseks on ootsüütide aneuploidsus.

Esinemissagedus suureneb naise vananedes.

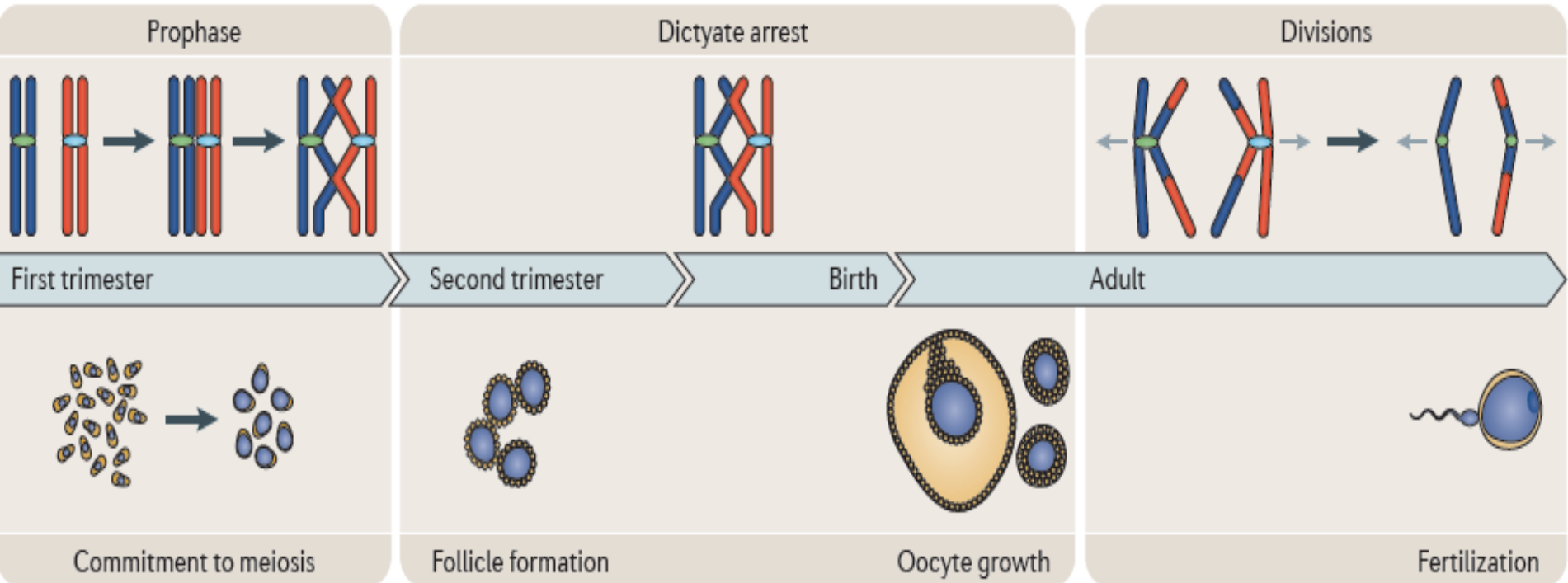
ANEUPLOIDUS on reeglina letaalne, erandina esineb elussünde sugukromosoomide trisoomiate ja 45,X0 monosoomia puhul, harvem autosoomide, peamiselt 21. kr, 13. ja 18. kr trisoomia puhul.

2012 Nagaoka et al.

Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem.

<https://www.nature.com/articles/nrg3245>

Figure 1. *Oogenesis and the female meiotic cycle.*



Vananemise mõju oogeneesile

Munasarjade füsioloogiline vananemine

-- ovariaalreserv väheneb, ootsüütide kvaliteet halveneb.

Ootsüütides:

- väheneb DNA-kahjustuse kontrollpunkti efektiivsus ja DNA reparatsioonivõime (vastavate ensüümide aktiivsus) I profaasis;
- väheneb rakutsükli regulaatorvalkude töövõime/ efektiivsus;
- **kohesiooni kadu** homoloogiliste kromosoomide/ tütarkromatiidide vahel;
- väheneb **käavisüsteemi kontrollpunkti (SAC) efektiivsus** metafasaasides;
- väheneb telomeeride pikkus, tekivad nt vigased käavisüsteemid. Nt kui follikulaarepiteeli rakkudes, siis nende funktsiooni halvenemine;
- väheneb kaitsevõime oksüdatiivse stressi vastu;
- halveneb mitokondrite funktsioon.

2023 Charalambous C et al. *Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing.*
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36068367/>

2023 Wang X et al. *Mechanisms of ovarian aging in women: a review.*
<https://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13048-023-01151-z>

Reproduktiivbioloogia ehk sigimisbioloogia **põhidogmaks** on: **primordiaalseid folliikuleid/ uusi munarakke** elu jooksul imetajatel **juurde ei teki**. Sünnihetkel olemasolevad on **allikaks** arenevatele folliikulitele ja ootsüütidele ning **nende arv väheneb vanusega**.

See põhiseisukoht pandi kahtluse alla aastal 2004 Jonathan Tilly uurimisgrupi poolt. Nimelt väitsid nad oma katsetulemustele toetudes, et täiskasvanud hiire munasarjades toimub neo-oogenees; et munasarja koore epiteelis, aga ka luuüdis on olemas idurakkude (end gonotsüütide) tüvirakke.

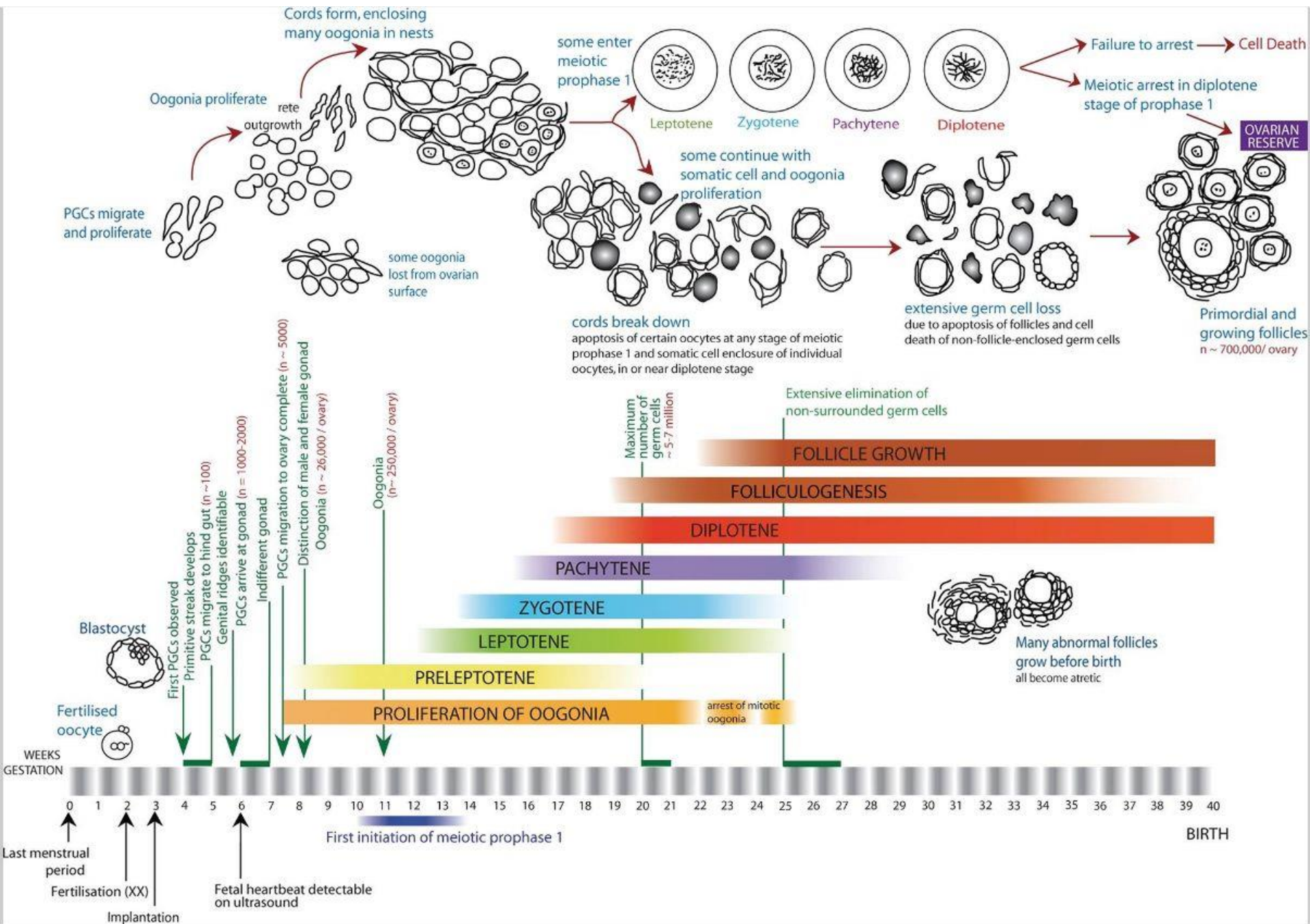
Pärast seda on püütud nende katseid korduvalt korrata, et siis kas tõestada või ümberlükata hüpoteesi, et primordiaalsetel folliikulitel on uuenemisvõime.

2020 märtsi artiklis* näidati veelkordselt, et imetaja **munasarjades tüvirakke ei esine**.

*2020 Wagner M et al. *Single-Cell Analysis of Ovarian Cortex Fails to Find Stem Cells*. NATURE.
<https://www.nature.com/articles/s41467-020-14936-3>

2019 Martin JJ et al. *Implications and Current Limitations of Oogenesis from Female Germline or Oogonial Stem Cells in Adult Mammalian Ovaries*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30696098>

2017 Porras-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. *Neo-oogenesis in mammals. Pro & Contra*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28780921>



Hartshorne GM et al. Figure 1: <https://academic.oup.com/molehr/article/15/12/805/1047018#18776135>

Tulevaste munarakkude arv

1 kuu vanusel embrüol on ~1 700 mitootilist idurakku, mis moodustavad embrüonaalse gonaadi.

2 kuu vanusel embrüol ~600 000 mitootilist oogooni

5 kuu vanusel lootel ~7 000 000 mitootilist oogooni

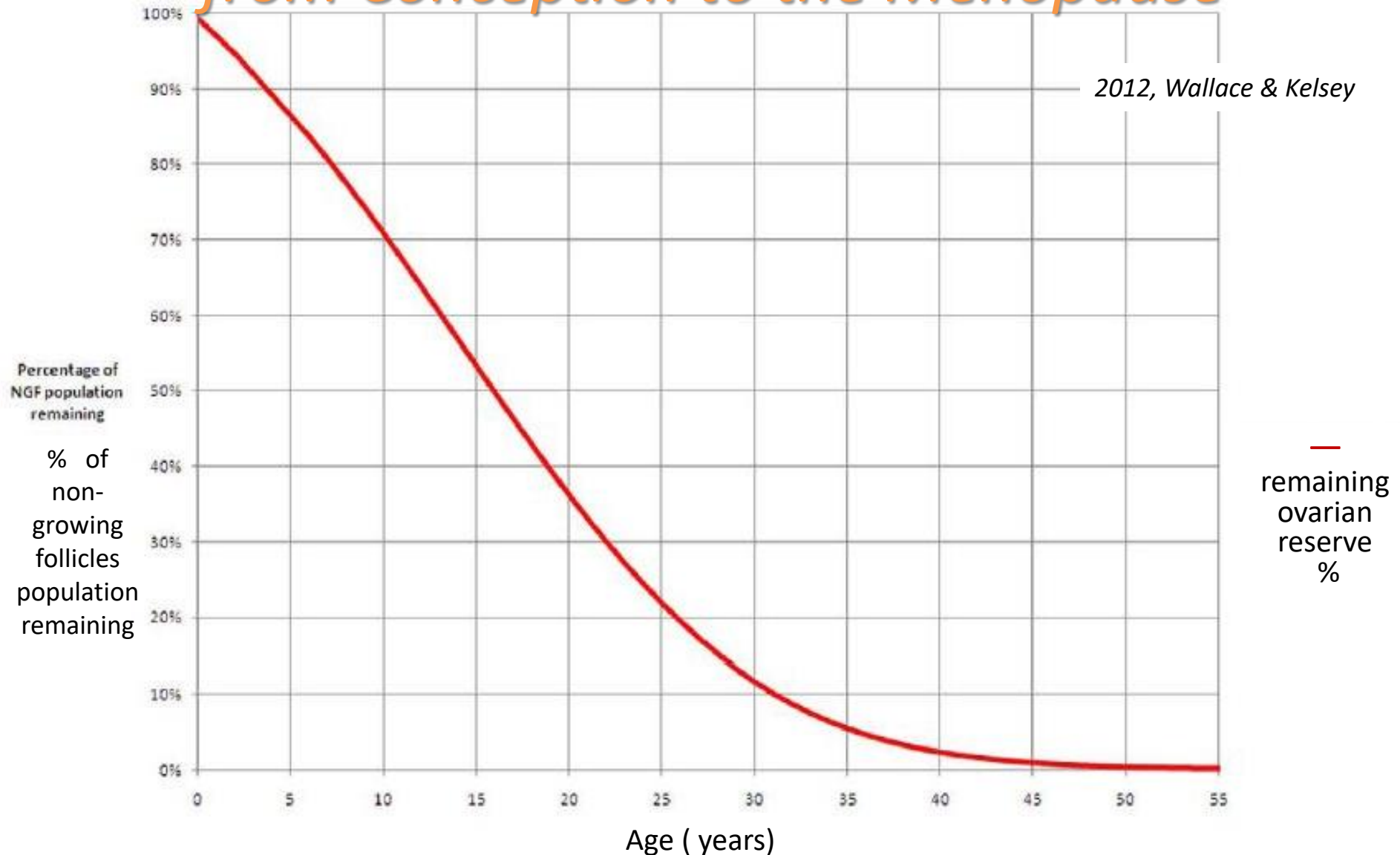
sünnihetkel 700 000 – 2 000 000 primaarset ootsüüti

puberteedi alguses ~300 000 primaarset ootsüüti

30 aastasel naisel ~85 000 primaarset ootsüüti

51 aastasel naisel ~1000 primaarset ootsüüti

Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause



2013 Zhang H et al. Combating ovarian aging depends on the use of existing ovarian follicles, not on putative oogonial stem cells. <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/146/6/R229.xml>

Munarakkude reserv, tulevaste munarakkude arv kahaneb pidevalt naise elu jooksul

Sünnihetkel ovaarides kuni 2 mln primaarset ootsüüti primordiaalses folliikulis, puberteedi alguseks ~400 000 primaarset ootsüüti primordiaalses folliikulis.

Tulevased munarakud võivad hukkuda oogeneesi erinevatel perioodidel. Põhjusteks võivad olla:

- meioosi sisenemise ebaõnnestumine
- krossingover'i ebaõnnestumine
- meioosi 1. seisakusse mineku ebaõnnestumine
- folliikuli moodustumise ebaõnnestumine
- ootsüüdi ja follikulaarepiteeli vaheliste rakukontaktide kadu
- ootsüüdi mitokondrite suur polümorfism jne

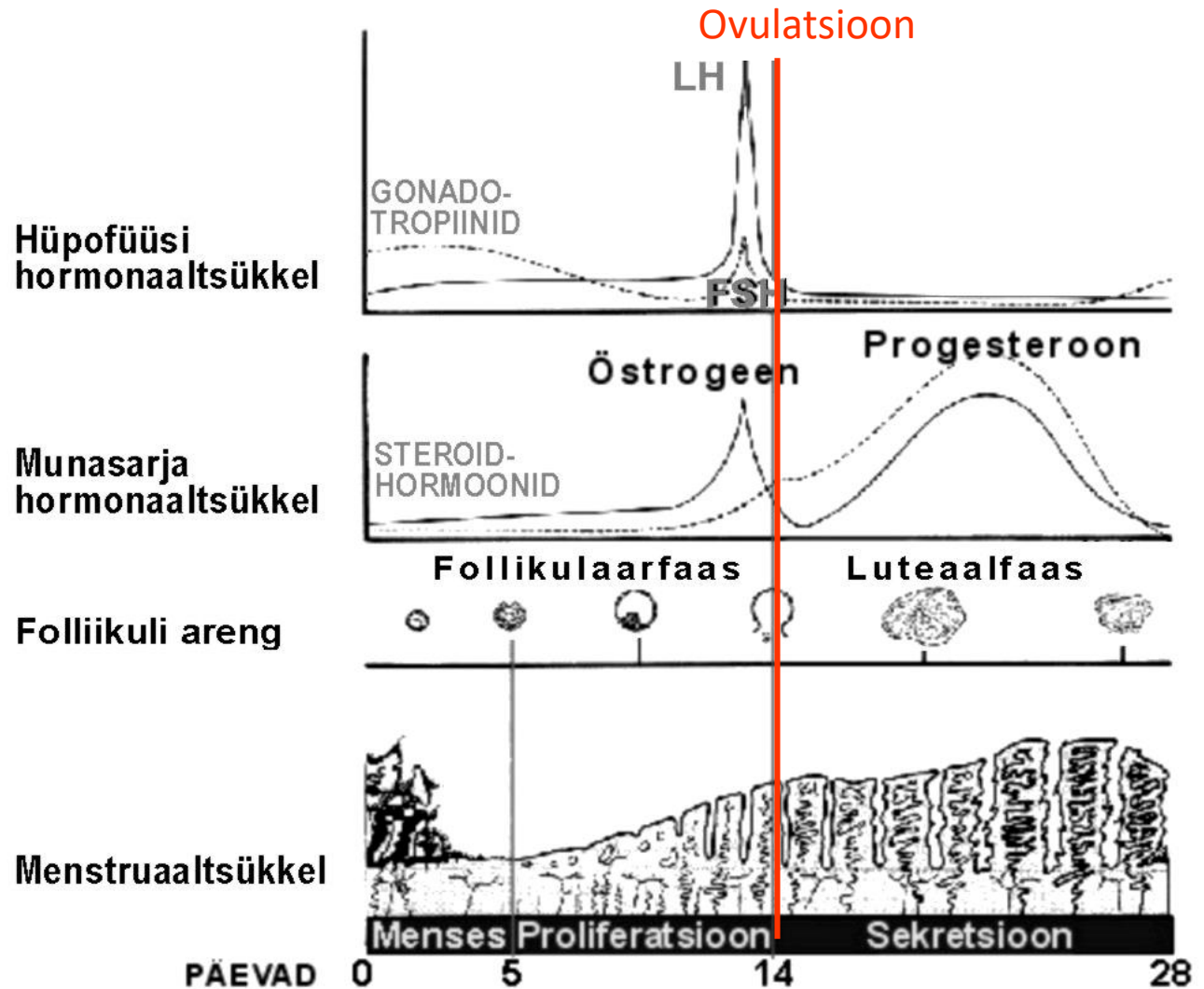
→ ootsüüdi APOPTOOS ja/või folliikuli atreesia

Hormonaaltsükliid ja ootsüüdi areng

Peamine roll on hüpotaalamusel ja tema neuroendokriinsel regulatsioonil, mis kontrollib hüpofüüsi eessagara hormoonide eritumist:

LH - luteiniseeriv hormoon

FSH - folliikuleid stimuleeriv hormoon



LISALUGEMIST: *Interactions and effects of the hormones with and on the follicle.*
<http://embryology.ch/en/embryogenese/fertilization/popup/mffollikel.html>

Naiste infertiilsus

Viljatuse peamisi põhjusi naistel:

- geneetilised põhjused ~10%
- oogeneesi puudulikkus s.h meioosi I profaasi häired
- ovulatsioonihäired kuni 27% - peamiselt hormonaalsetel põhjustel
- anatoomilised probleemid kuni 22%
- infektsioonid, põletikud kuni 60% tagajärg: munajuhade sulgumine, emaka limaskesta kahjustumine jm
- endometrioos kuni 30%
- emakamüoom
- immunoloogilised probleemid
- keskkonna kahjustav mõju toksiinid (bisfenool A, ftalaadid, etanool, ravimid), kiirgus, eluviis
- naise ema eluviisid nt toitumine, hormonaalsete kontratseptiivide kasutamine

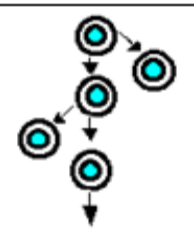
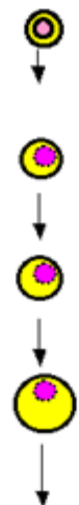
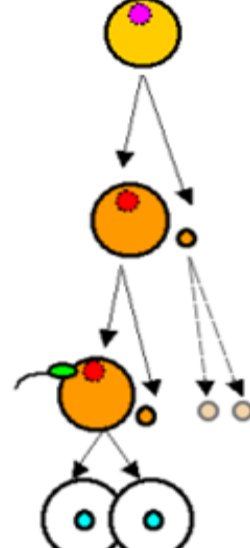
VILJAKUSE hindamine.

Munarakkude arvu/varu hindamine: hormoonitaseme (nt [FSH](#)) mõõtmise testid

Menopausi algus: [geenitestid](#) - Tartu teadlased töötasid välja - Novaator

Oogenees,

kokkuvõttev tabel

Ontogeneesi perioodid		Asukoht	OOGENEES ehk OVOGENEES		Staadiumid
PRENATAALNE	EMBRYO	MUNASARJAAALGE	Migratsioon ja mitootiline paljunemine		JAGUNEMINE
	LOODE		Viimane INTERFAAS		OOGOONID
POSTNATAALNE	LAPS	MUNASARI	MEIOOSI algus		PRIMAARNE OOTSÜÜT
	REPRODUKTIIVNE		Meioosi I BLOKAAD I profaasis		Primordiaalne folliikul
			KASVUPERIOOD		Primaarne folliikul
	IGA	IG A	Meioosi I BLOKAADI lõpp = meioosi jätkumine	Sekundaarne folliikul	KASVAMINE
			Meioosi II BLOKAAD II metafaasis	Graafi pöieke	
			OVULATSIOON	SEKUNDAARNE OOTSÜÜT ja I polaarkeha	KÜPSEMINE
	MUNAJUHA	VILJASTUMINE		VILJASTATUD OOTSÜÜT ja polaarkehad	
		SÜGOODI LÕIGUSTUMINE	KAHE BLASTOMEERI STAADIUM		

ANIMATSIOONID

<https://lepo.it.da.ut.ee/~dyyna/>

- Ovogenees: a) ovariaaltsükkel; b) hormonaalne kontroll
- Ovulatsioon (*Nucleus Medical Media* animatsioon, 2012)
- Hormoonid ja ovulatsioon (*Nucleus Medical Media* animatsioon, 2011)

FILMIÕHTUKS



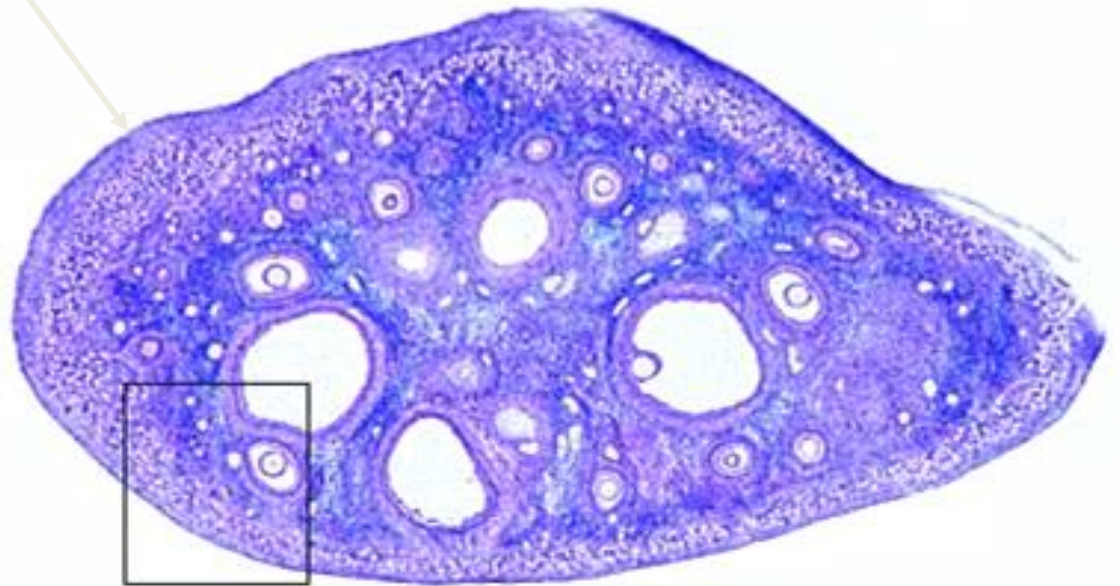
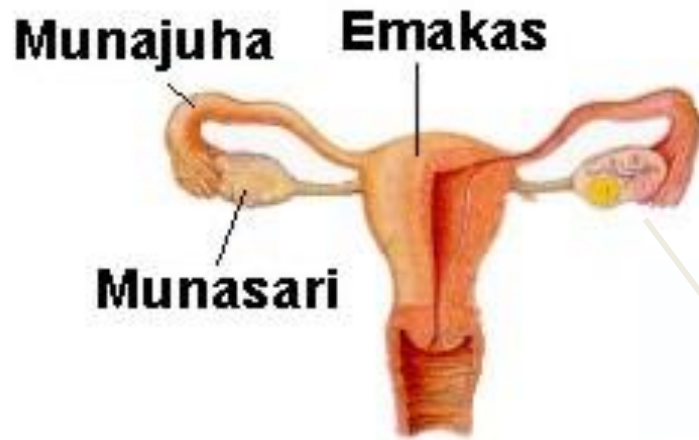
NUCLEUS *Medical ANIMATIONS 3D*

Ovulatsioon <https://catalog.nucleusmedicalmedia.com/view-item?ItemID=67312>

Oogenees Hormonaalne regulatsioon Viljastumine

<https://catalog.nucleusmedicalmedia.com/hormones-and-ovulation/view-item?ItemID=72547>

Folliikuli areg munasarjas



Histoloogiline preparaat 100 x
H&E

Oogenees

Mitootiliselt jagunevad oogoonid embrüos

Meioosi algus

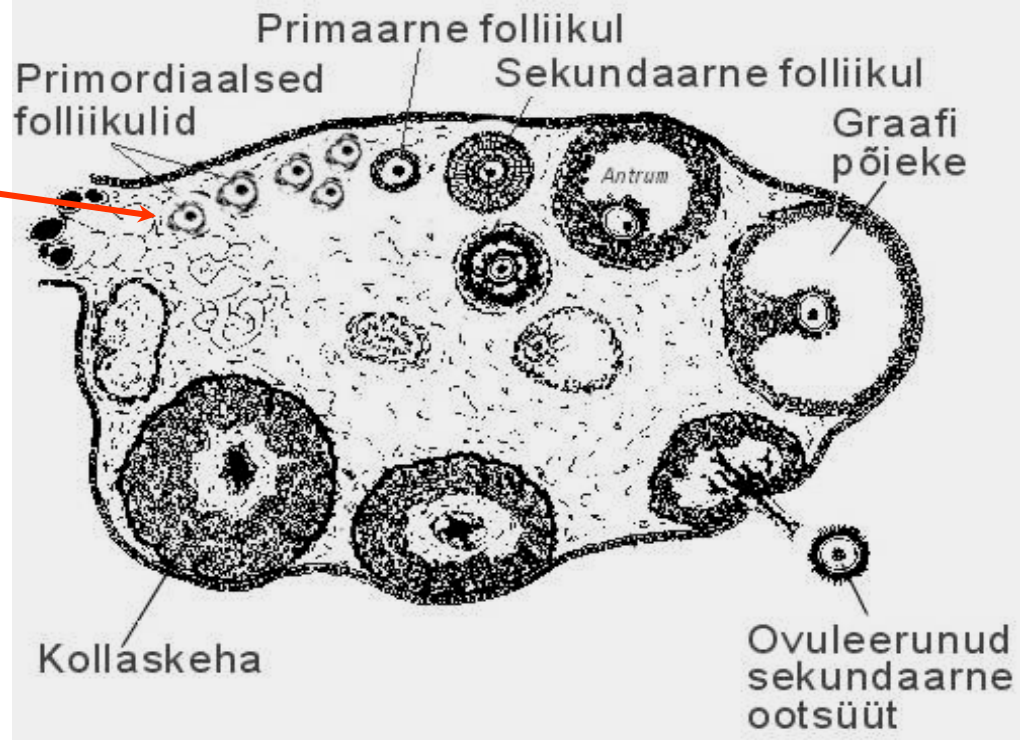
Primaarne ootsüt

Sekundaarne ootsüt ja polaarkeha

Viljastumine

Meioosi lõpp

Folliikuli arenemisperioodil on ootsüt on meioosi I **profaasis**



Ristlõige munasarjast

Erickson GF, PhD. *Follicle Growth and Development*.

<https://www.glowm.com/section-view/heading/Follicle%20Growth%20and%20Development/item/288#>

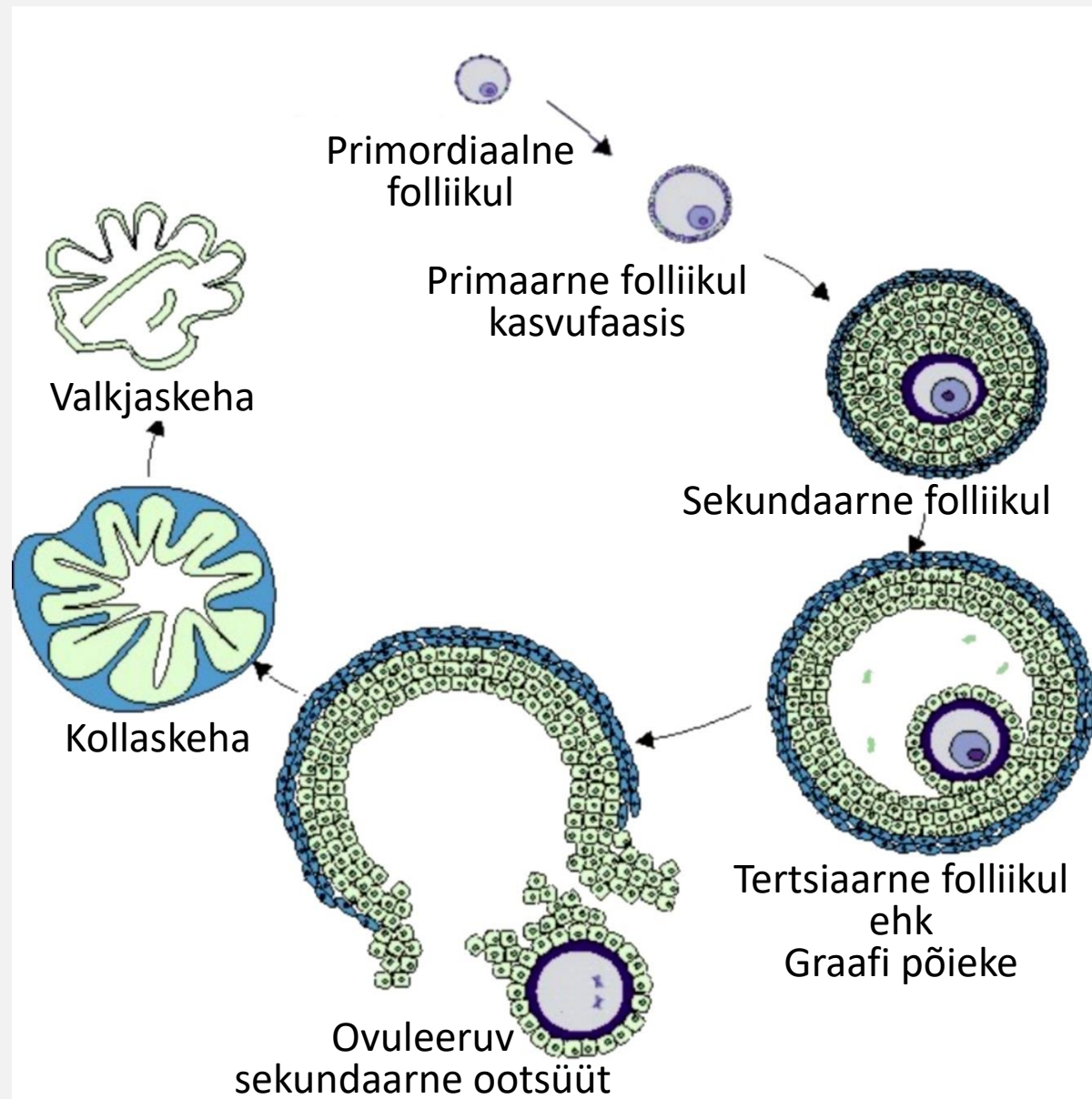
Folliikuli arengu skeem

Folliikul koosneb:

- primaarsest **ootsüüdist** ja
- teda ümbritsevatest **folliikulaarepiteeli** rakkudest

Follikulaarepiteeli rakud toetavad ootsüüdi arengut:

- alimontaarselt
- sünteesivad östrogeeni
- edastavad signaalmolekule



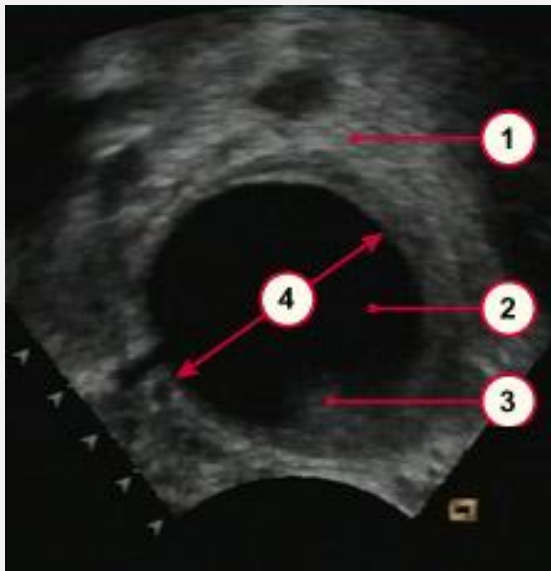
Oogenees. Kasvuperiood

Kasvuperioodil toimub **folliikuli areng ja suurenemine.**

Folliikul = ootsüüt + teda ümbritsevad follikulaarepiteeli rakkude kihid.

Folliikuli kasvamine ja mõõdud:

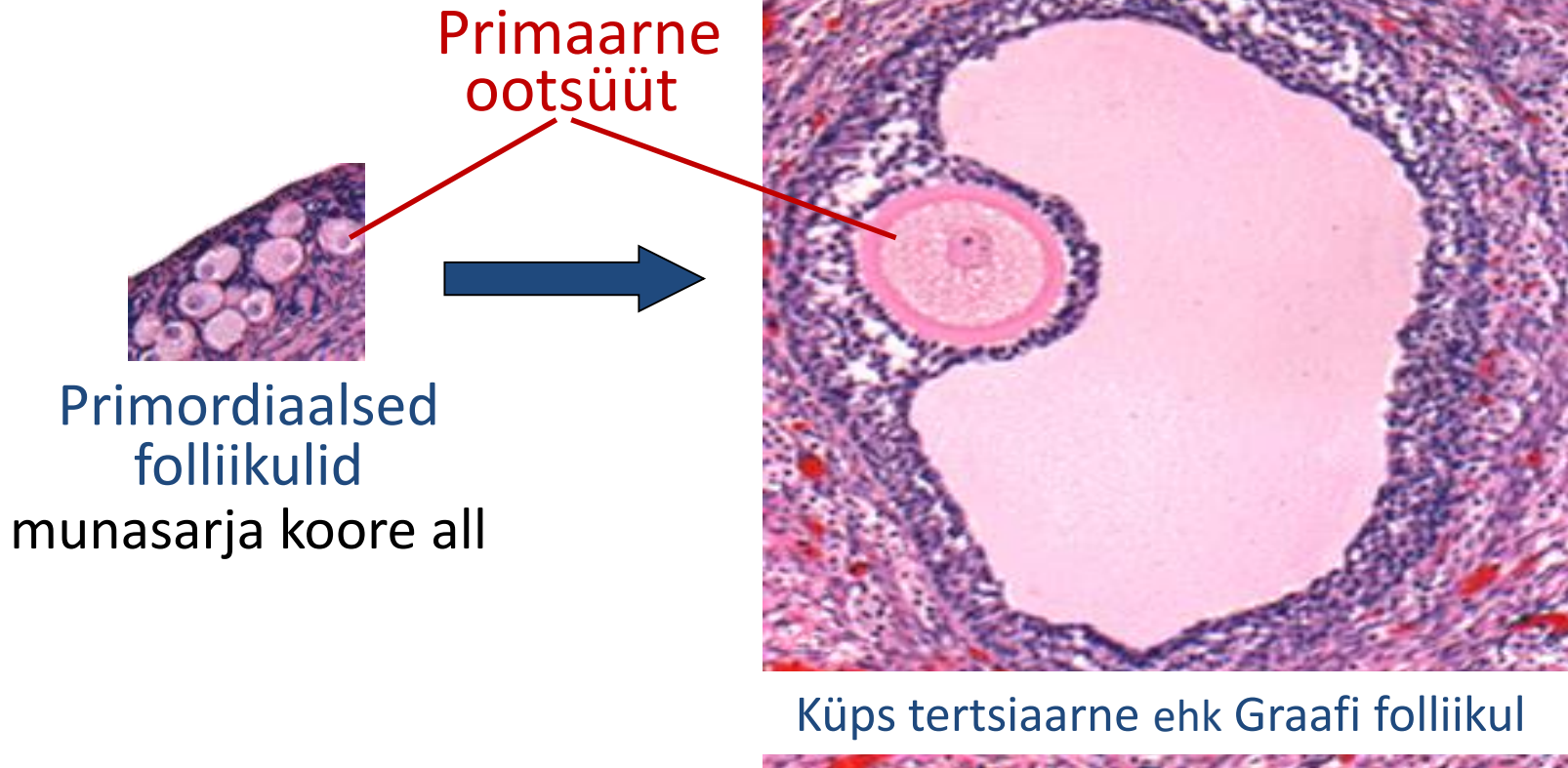
primordiaalne folliikul 25-35 μm	}	aeglane kasv (kestab umbes pool aastat)
noor Graafi pöieke 200-400 μm		
ovuleeruv Graafi pöieke ~ 23 mm		



Ultrahelipilt Graafi pöiekeseest

- 1 – munasarja strooma
- 2 – folliikuliõõs
- 3 – follikulaarepiteeli ehk granuloosa rakud
- 4 – Graafi pöiekese läbimõõt ~ 23 mm

Kasvuperioodil toimub primaarse ootsüüdi areng ja suurenemine



Ootsüüdi maht suureneb ~40 korda,
ootsüüdi diameeter suureneb $30\ \mu\text{m} \rightarrow 120\ \mu\text{m}$.

Inimese embrüonaalne munasari, oogoonid

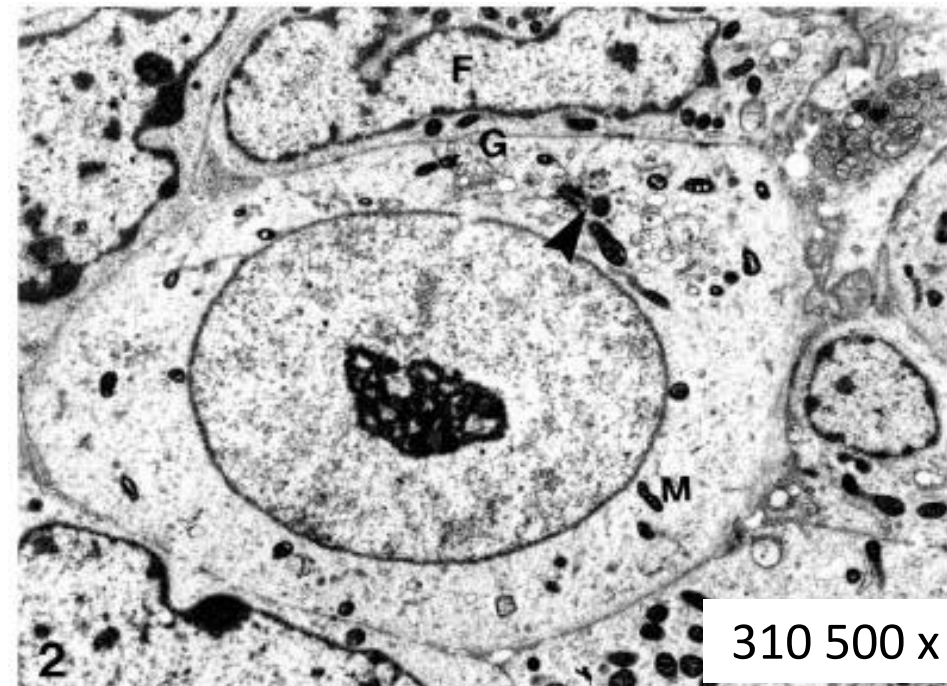
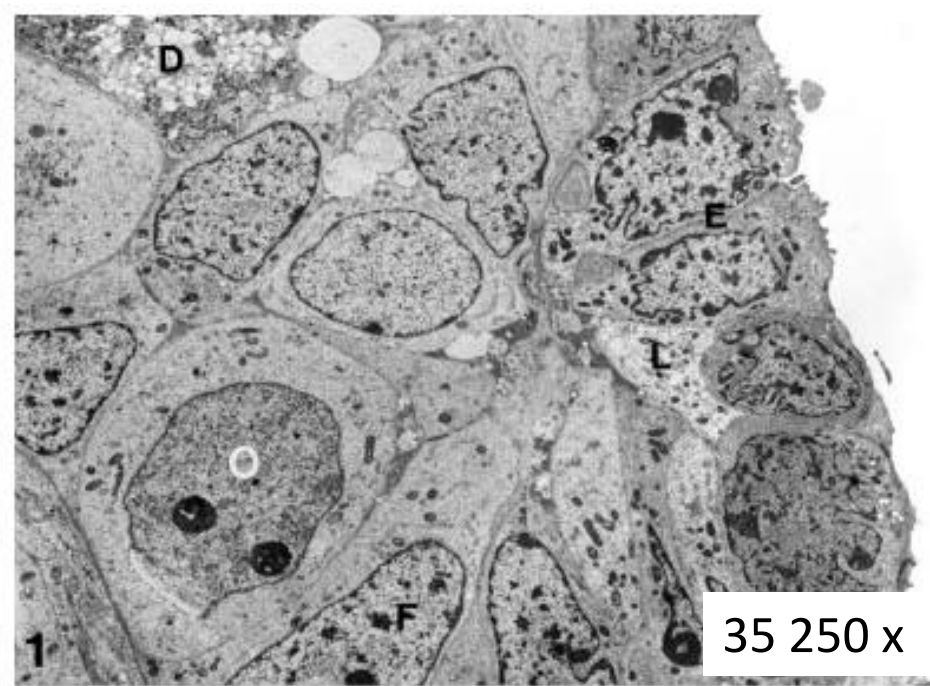


Fig. 1:
Surface of fetal ovary (15 weeks) showing coelomic epithelium (E) and **oogonium** (O) surrounded by **potential follicle cells** (F). D, degenerating cell; L = light cell.

Fig. 2: **Oogonium** with a central nucleus, containing a reticulated nucleolus, surrounded by potential follicle cells (F). Note sparse cytoplasm with mitochondria (M) and **two centrioles** (arrowhead) associated with a Golgi complex (G).

Selvaraj, Sathanathan, 2003

Inimese **primaarne ootsüüt** kasvufaasis

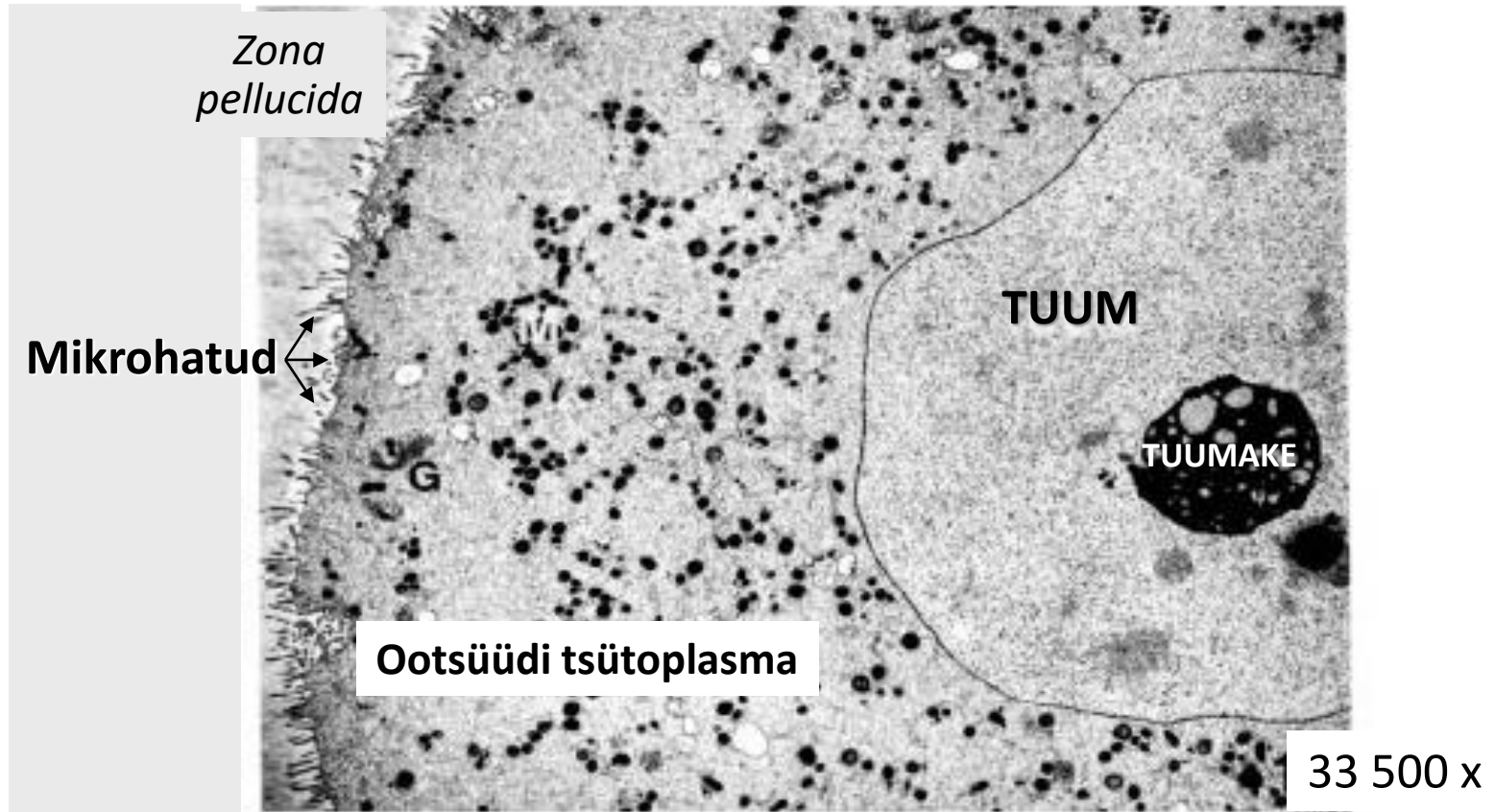
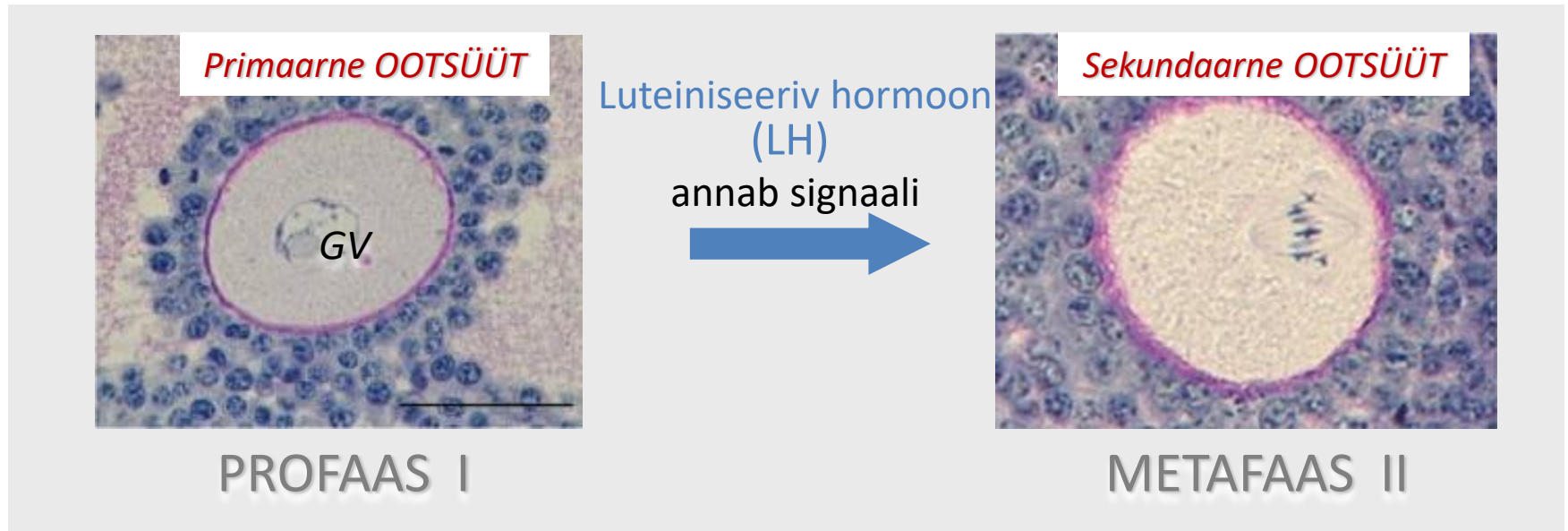


Fig. Aspirated **growing oocyte** from a small antral follicle.

Note reticulated nucleolus in nucleus and CGs separated from oolemma beset with numerous microvilli. G, Golgi complex; M, mitochondria; Z, zona.

Ootsüüdi valmistumine ovulatsiooniks.

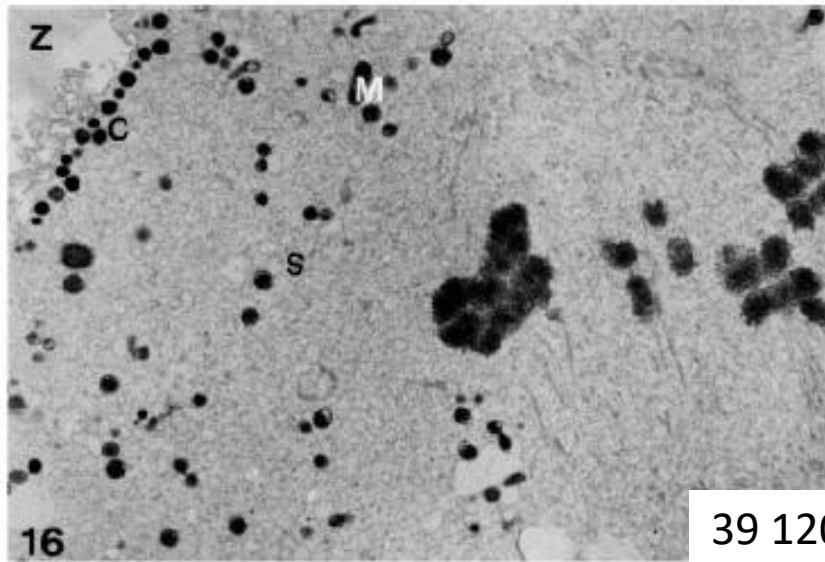
Meioosi I blokaadi lõpp ja meioosi jätkumine



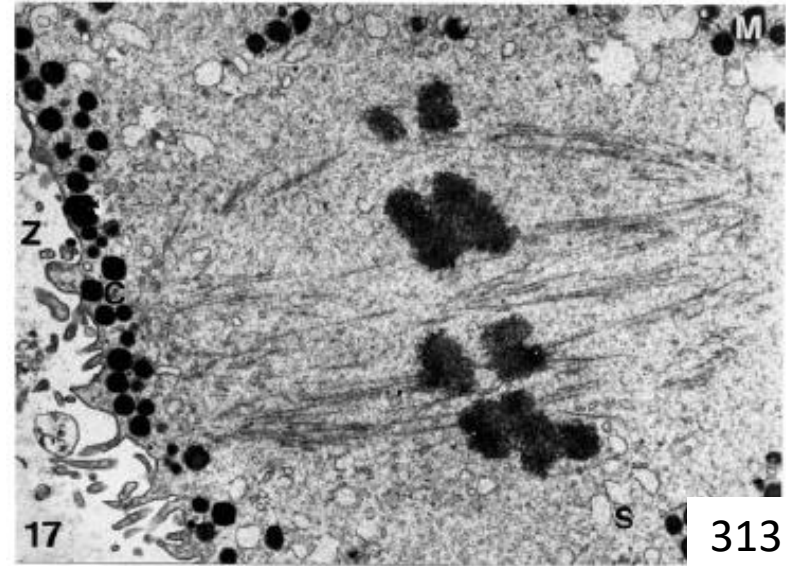
24-38 tundi enne ovulatsiooni lõpeb ootsüüdis meioosi I blokaad, ootsüüt siseneb **KÜPSEMISPERIOODI**, s.t meioos kulgeb edasi **I profaasist kuni II metafasaani**.

Toimub *GVBD* (*Germinal Vesicle Breakdown*), s.t I profaasis ootsüüdi tuumaümbrise lagunemine, ootsüüt läheb I metafasi ning meioos kulgeb edasi kuni II metafasaani, s.t oogeneesi II blokaadini.

I metafasis ja II metafasis inimese ootsüütides. Käävi orientatsioon ootsüüdis



39 1200 x



313 200 x

Fig. 16: **Metaphase I oocyte** showing spindle with chromosomes. The CGs (C) are aligned close to oolemma. M, mitochondria; S, SER; Z, zona.

Fig. 17: **Metaphase II oocyte** with characteristic, barrel-shaped spindle with chromosomes at the equator. There are neither centrioles nor dense centrosomal material at the poles. Note several CGs (C) above spindle zone. M, mitochondria; S, SER; Z, zona.

Sathananthan, 1985, 1988

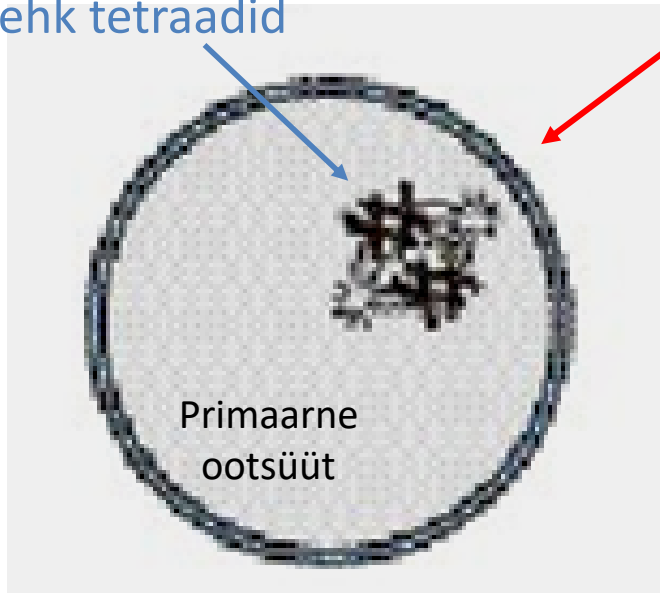
Imetajate (v.a hiirte) ootsüütides “kaovad” pärast meioosi I profaasi tsentrioolid - ootsüüdi tsentrosoomid on **atsentriolaarsed**.

2015 Avidor-Reiss T et al. Atypical centrioles during sexual reproduction.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4381714/>

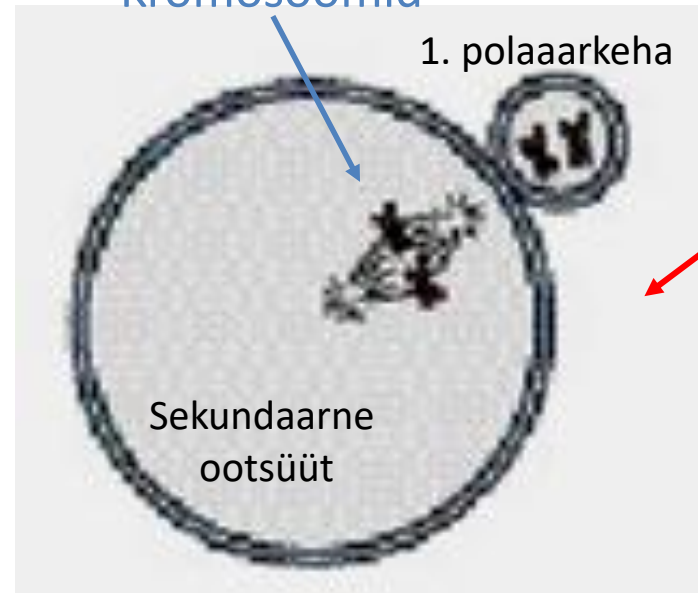
Käävi orientatsioon ootsüüdi meioosil

Bivalendid
ehk tetraadid



Metafaas I

Kromosoomid



Metafaas II

Praktiline töö 15. Meioos loomises organismis.

Küpsemisjagunemised ehk **meioos** solkme (*Ascaris sp.*) munades. Objektiks on mudelorganism, ümaruss solge ($2n = 4$).

- Ümarussidel on munarakud **meoosi I profaasis viljastumise** hetkel.
- Pärast spermi ootsüüti sisenemist, pärast viljastumist, väljub ootsüüt meoosi blokaadist ja jätkab meoosi – meoosi ehk küpsemisjagunemiste lõppedes moodustub **emaspronukleus** $1n1c$.
- Ootsüüti tunginud spermi tuum paikneb/on munaraku keskel ja „ootab”, kuni ootsüüt oma meoosi lõpetab – moodustub **isaspronukleus** $1n1c$.
- Moodustunud sügoot $2n2c$ läbib DNA-replikatsioonifaasi – moodustub **sügoot** $2n4c$, mis hakkab mitootiliselt jagunema ehk **lõigustuma**.

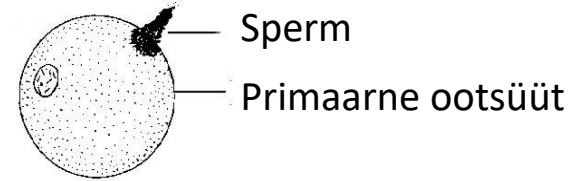
Ülejärgmise slaidi joonisel on näha solkme emaka ristlõikel munakestadega ümbritsetud viljastatud ootsüüte erinevates meoosi staadiumites, pronukleuste staadiumis ning esimesel lõigustumisjagunemisel.

Mudelorganism *Ascaris*'e

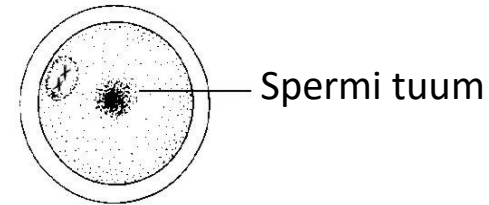
ootsüüdi
meiootilised
jagunemised,
sügoodi
moodustumine
ja
lõigustumise
algus

Spermi sisenemine

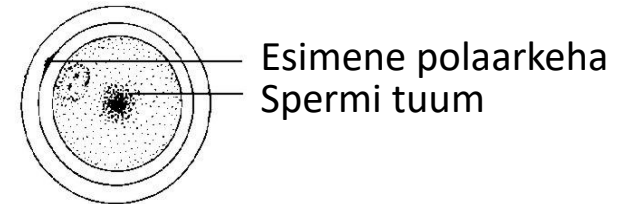
Meioosi I pool
I profaas



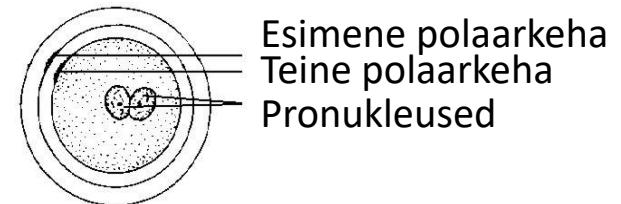
I metafaas



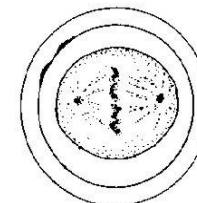
Meioosi II pool



Pronukleuste
staadium

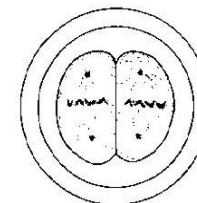


Sügoodi
lõigustumise
algus



I lõigustumisjagunemine
METAFAAS

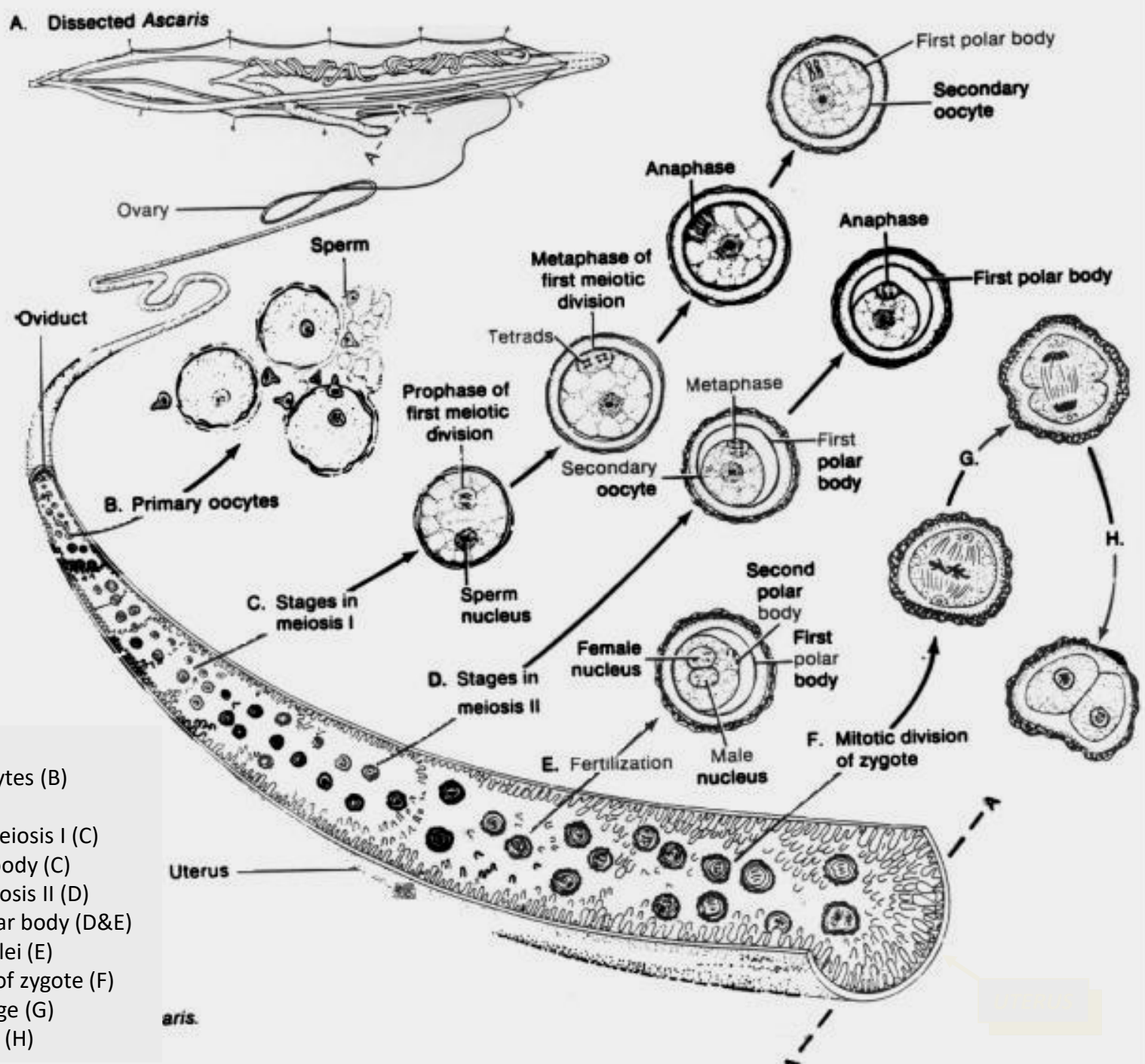
Kahe blastomeeri
staadium



II lõigustumisjagunemine
METAFAAS

Solkme torujas emakas sisaldab erinevates arengujärgkudes ootsüüte. Ootsüüte ümbritsevad munakestad.

NB!
Ootsüüdi viljastumine toimub 1. profaasis.



- dissected *Ascaris* (A)
- unfertilized primary oocytes (B)
- sperm entrance (B)
- oocyte with tetrads in meiosis I (C)
- formation of first polar body (C)
- secondary oocyte in meiosis II (D)
- formation of second polar body (D&E)
- male and female pronuclei (E)
- first mitosis metaphase of zygote (F)
- first cytokinesis = cleavage (G)
- two blastomere stadium (H)

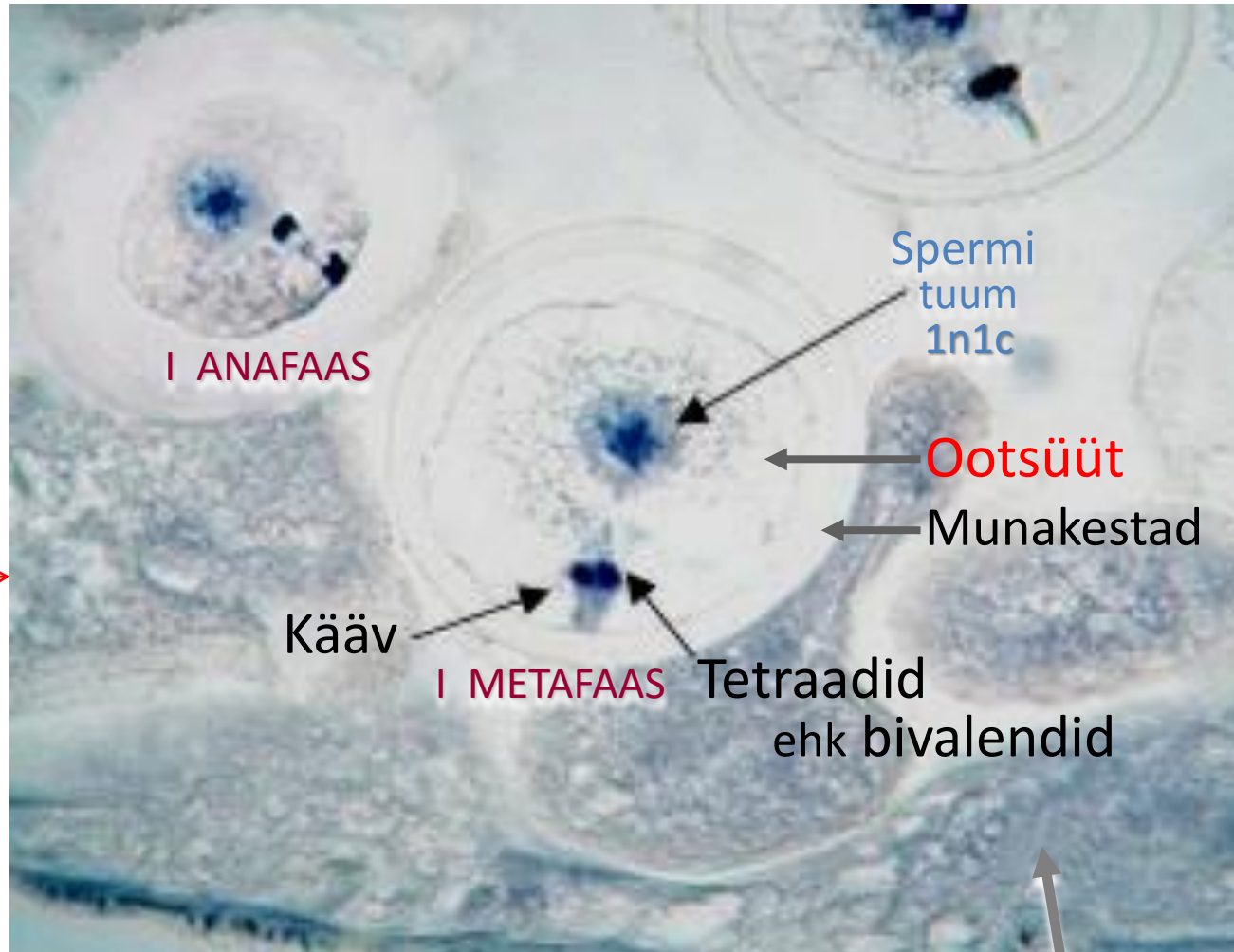
Meioos loomarakus. Preparaat.

Solkme ootsüüdi küpsemisjagunemised

Ristlõik solkme emakast



Suurendus 40 x

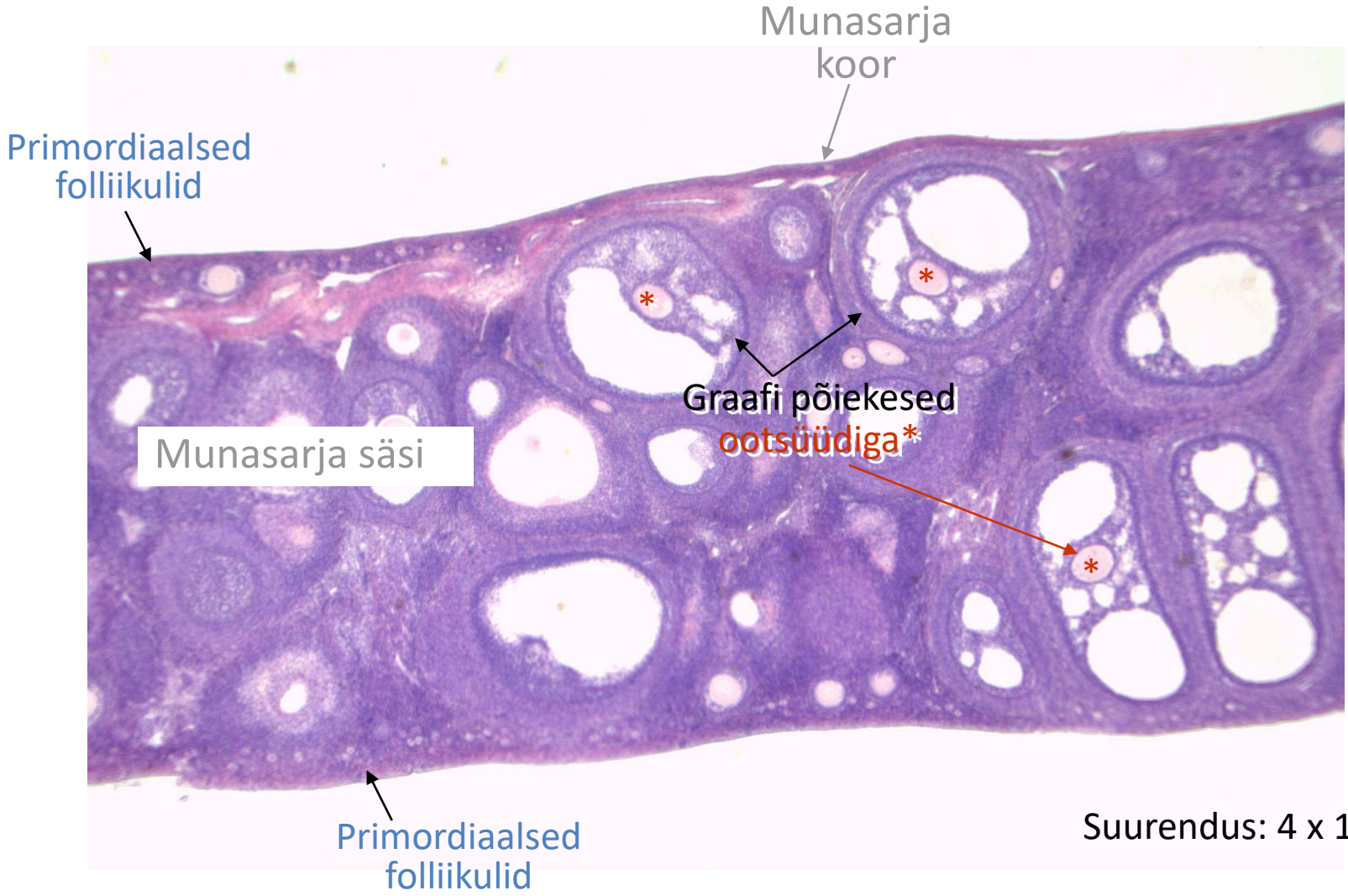


Suurendus 400 x

Emaka sein

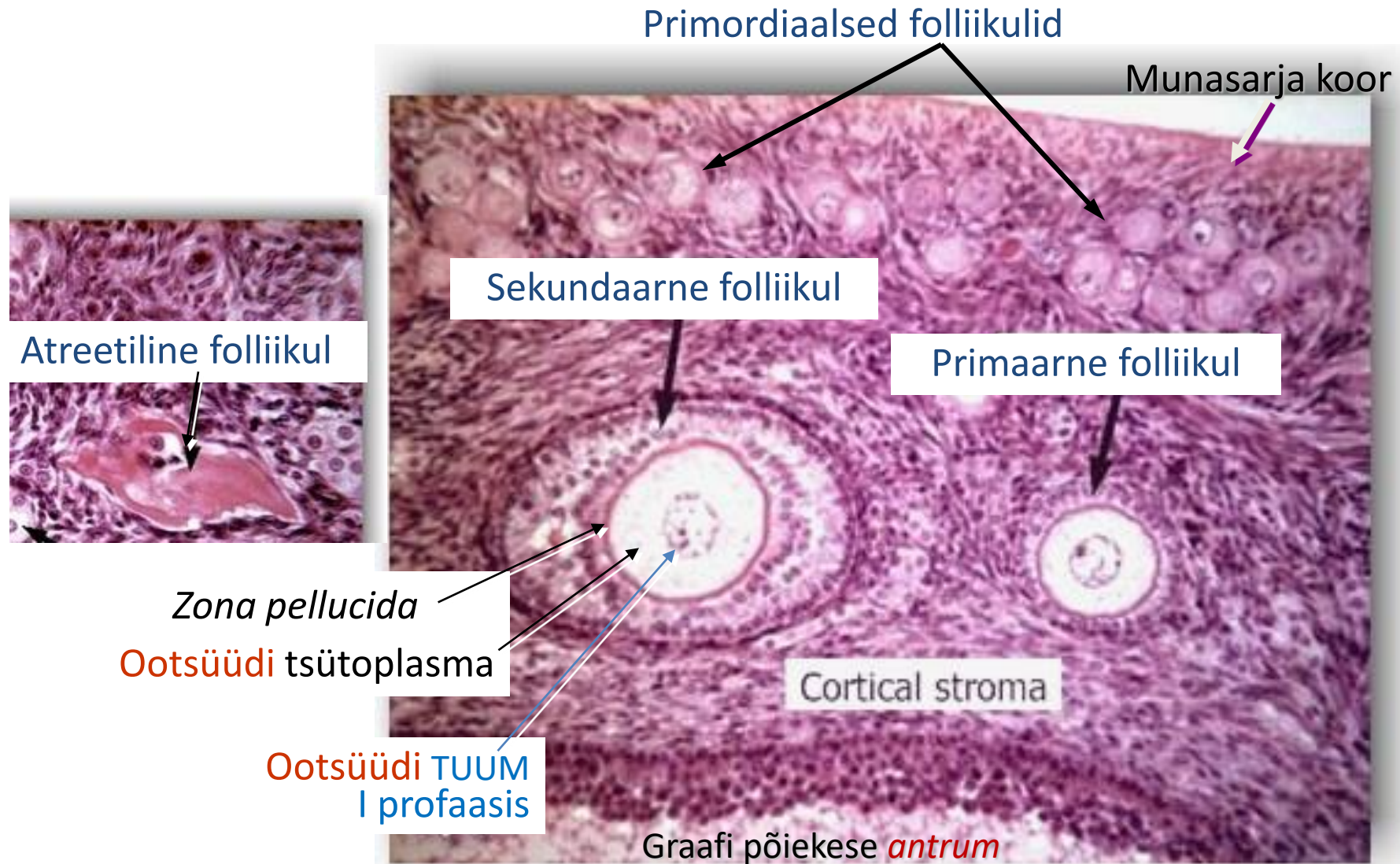
Praktiline töö 16. Imetaja munasari.

Pikilõik kassi munasarjast, püsipreparaat



Suurendus: 4 x 10

Sektor kassi munasarja preparaadist



Ovotsüüt saavutab oma maksimaalse suuruse (inimesel $\sim 120 \mu\text{m}$) sekundaarses folliikulis (meioos sel ajal seisab – on I blokaad ja I profaas).

Küps Graafi põieke ehk pre-ovulatoorne folliikul



Primaarne ootsüüt
ja selle tuum I profaasis

Zona pellucida

Folliikuliõõs

Corona radiata –
ootsüüti ümbritsevad
follikulaarepiteeli rakud

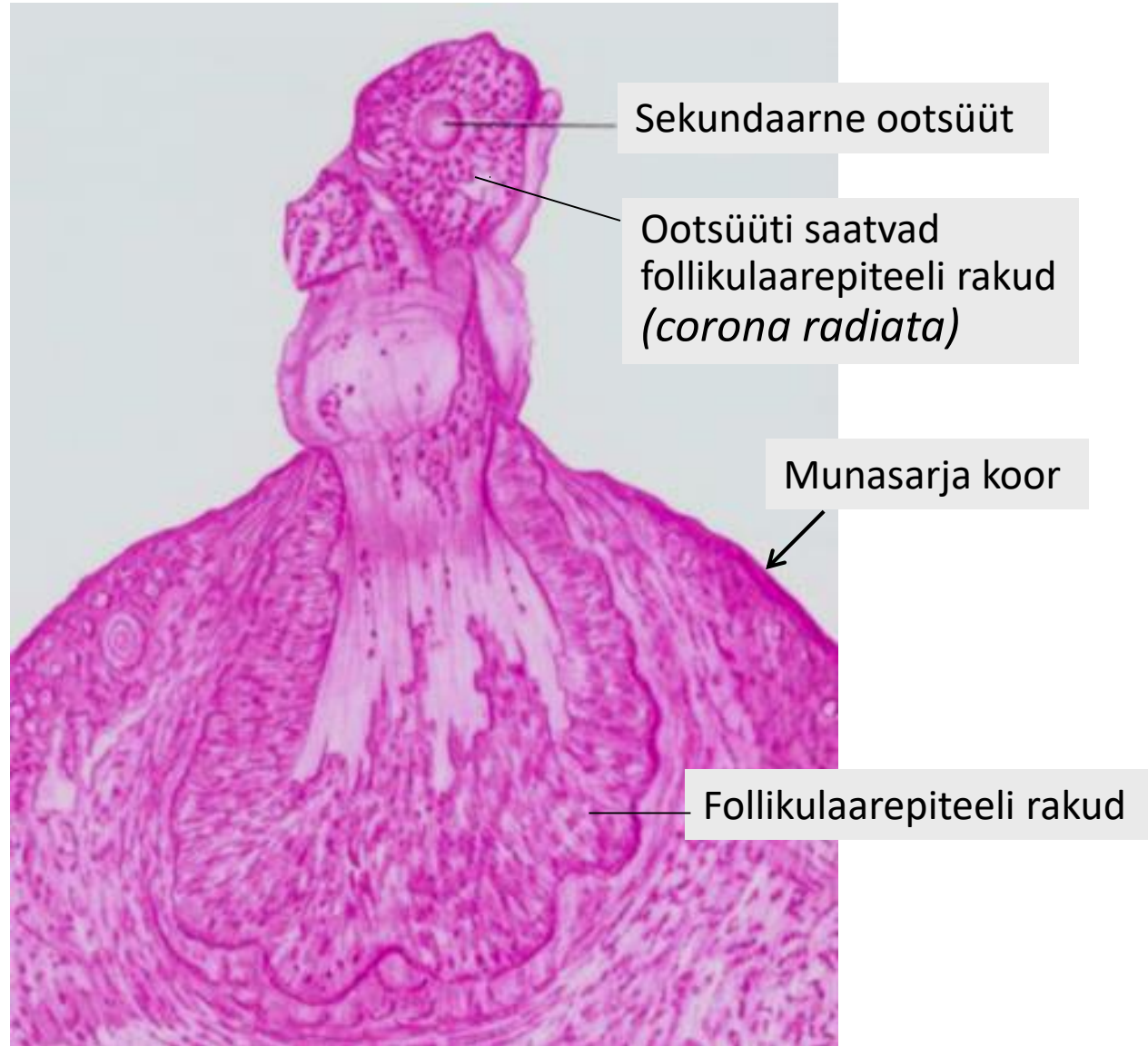
Granuloosa ehk
follikulaarepiteel

Basaalmembraan

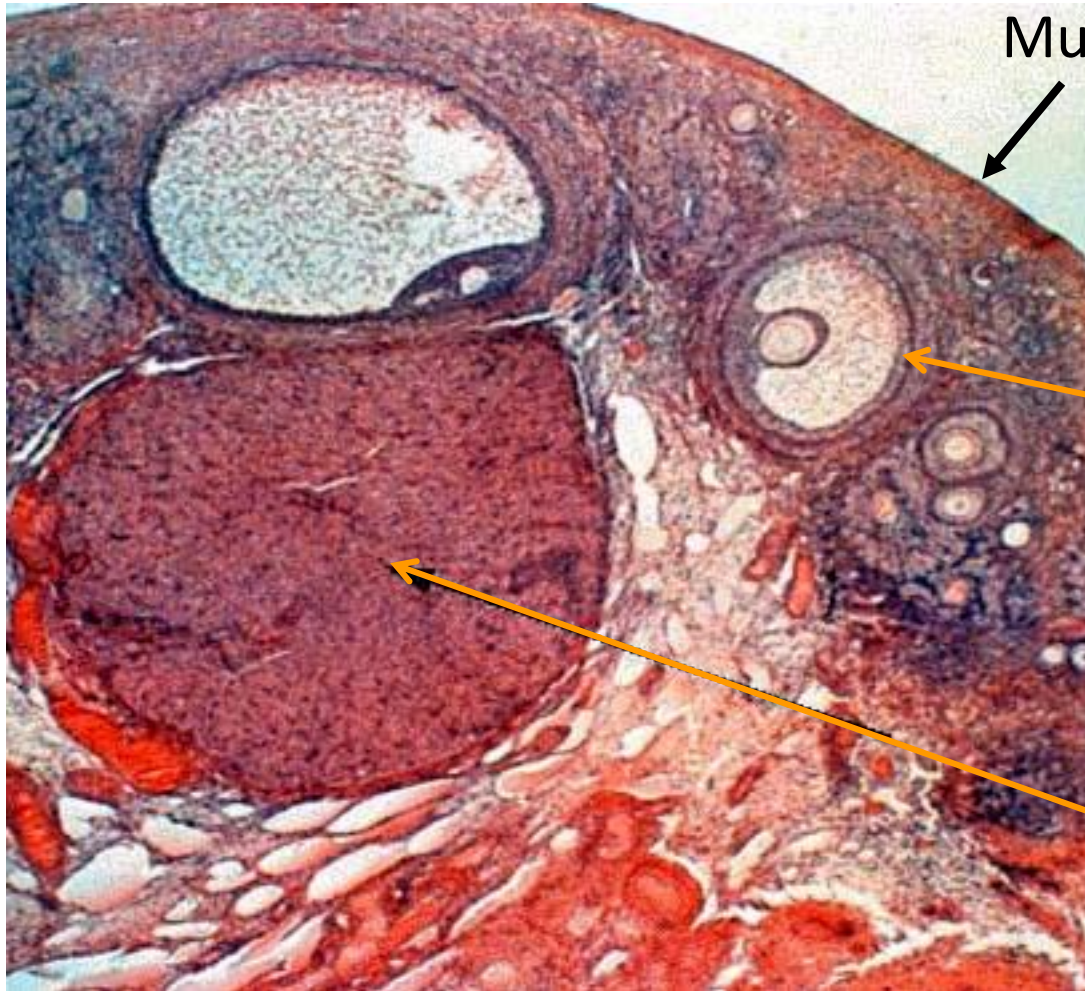
Teeka

(nt androgeenide süntees)

Sekundaarne
ootsüüt
II metafaasis
ovulatsiooni
hetkel



Kollaskeha ja Graafi pöieke. Preparaat



Munasarja koor

Tertsiaarne folliikul

Kollaskeha
Corpus luteum