

돼지 난포내 Alkaline Phosphatase 및 Adenosine Triphosphatase의 활성부위와 활성도

한양대학교 자연과학대학 생물학과

김문규 · 계명찬 · 윤현수 · 김종흡

Localization and Activity of Alkaline Phosphatase and Adenosine Triphosphatase of Ovarian Follicles in Pig

Moon Kyoo Kim, Myung Chan Gye, Hyun Soo Yoon and Jong Heup Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

= Abstract =

In order to study the growth and maturation of ovarian follicle, the localization and activity of alkaline phosphatase(ALPase) and adenosine triphosphatase(ATPase) of the granulosa cells and theca layer were examined according to the follicle size, the follicle state and the ovarian cyclic phase in pig. Theca interna of the small follicles was more heavily localized with reaction product by the activities of ALPase and ATPase than that of the large follicles. It is assumed that, as the follicles proceed to growth and maturation, antrum formation is the result of the follicular fluid accumulation by means of active transport by the activities of ALPase and ATPase in theca interna. The activities of ALPase and ATPase in atretic follicles were higher than those of normal follicles. These results imply that the mechanisms of follicle maturation and atresia are different according to the phase of ovarian cycle.

서 론

포유류 난포의 성장 성숙은 생식소자극호르몬과 스테로이드호르몬의 주기적인 상호 되먹임조절작용(feed-back regulation)에 의하여 난자의 성숙 및 배란도 주기적으로 이루어진다(Channing & Kammerman, 1973; Amin et al., 1976; Richards, 1980; Tsafirri & Braw, 1984; Guraya, 1985). 돼지에서 난포기(follicular phase) 난포의 과립세포에서 폐쇄가 진행됨에 따라 현저한 스테로이드합성능력을 갖는 미세구조적 변화가 관찰되었고, 황체기(luteal phase) 난포의 과립세포에서는 이러한 구조가 관찰되지 않아 난소의 주기에 따라 서로 상이한 기작에 의하

여 폐쇄현상이 일어나는 것으로 시사되었다(Kim et al., 1987).

난포액은 체액에 비하여 높은 K^+ , Na^+ 이온의 농도를 나타내고 있으며(Edward, 1974), 난포에 강소가 형성되면서 난포내로 체액이 유입될 때 에너지가 필연적으로 요구되므로 adenosin triphosphatase(ATPase)가 작용하고 있음을 시사하였다(Kim & Kim, 1983). 생체막의 물질수송에 관여하는 alkaline phosphatase(ALPase)(Bowers & McComb, 1975; Tokumitsu & Fishman, 1983)는 이상비대한 난포막층에 강한 활성을 나타낸다고 보고하였다(Guraya, 1985). 그러나 포유류의 발정주기에 따른 난포의 ALPase 및 ATPase의 활성도에 관하여는 거의 밝혀지지 않는 상태이다.

본 연구는 돼지의 발정주기에 따른 ALPase와 ATPase의 활성부위를 관찰하고, 활성도를 측정함으로써 이들 효소가 난포의 성장과 성숙

*본 연구는 1990년도 문교부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

에 어떠한 관계가 있는지 알아보기 위하여 이 실험을 행하였다.

재료 및 방법

돼지의 난소는 도살장(우성농역(주), 서울 마장동 소재)에서 채취한 후 얼음상자(4°C)에 넣어 즉시 실험실로 운반하였다. 운반한 난소는 황체의 유, 무에 따라 황체가 없는 난소를 난포기 난소로, 황체가 있는 난소를 황체기 난소로 난소주기를 구분하였으며, 각각의 난소에서 난포를 낱개로 적출하여 크기에 따라 소난포(직경 3.5mm 이하, S), 중난포(직경 4.5-6mm, M) 그리고 대난포(직경 7mm 이상, L)로 분류하였다. 적출한 난포는 급냉동(-70°C)시킨 후 8 μ m의 두께로 잘라 일부 절편은 hematoxylin-eosin으로 염색하여 Kim 등(1986)의 판정방법에 따라 정상군과 폐쇄군을 선별하여 실험에 이용하였다. 나머지 절편은 Gomori 등(1941)의 방법을 변용하여 phosphatase의 활성부위를 조사하였다. ALPase의 활성부위를 알아보기 위한 반응액은 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 9.0)내, 2% sodium β -glycerophosphate, 2% Ca(NO₃)₂, 2%

MgCl₂, 그리고 2% Co(NO₃)₂를 사용하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. ATPase의 활성부위를 알아보기 위한 반응액은 0.1M cacodylate 완충액(pH 7.2)내, 2% Pb(NO₃)₂, 2% MgCl₂ 그리고 0.125% ATP를 사용하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 동일 완충액으로 세척하고 1% (NH₄)₂S로 발색시켜 광학현미경하에서 관찰하였다.

난포의 일부분을 잘라내고 남은 조직에서 과립 세포와 난포막층을 분리하여 homogenizer와 sonicator로 조직과 세포를 분쇄한 후 Ernst(1972)의 방법을 변용하여 phosphatase의 활성도를 측정하였다. 즉, 반응액은 전술한 각각의 완충액에 10mM KCl, 10mM MgCl₂를 혼합하고 기질은 5mM *p*-nitrophenyl phosphate(*p*-NPP)를 사용하여 30분간 반응시켰다. 37.5% trichloroacetic acid(TCA) 1ml로 반응을 정지시키고, 효소에 의한 분해산물인 *p*-NP를 2N NaOH 2ml로 재발색시킨 후, 800g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액은 위와 동일조건하에서 일련농도의 *p*-NP(Sigma)용액을 표준 삼아 분광광도계(spectrophotometer, Shimadzu, UV-150-02)를 사용하여 파장 410nm에서 흡광

Table 1. Alkaline phosphate activity of granulosa cells according to the follicle size and the follicle state in the porcine ovary

Phase of ovarian cycle	Follicle state	Follicle size(diameter)		
		Small (3.5mm <)	Medium (4-6mm)	Large (7mm >)
Follicular	Normal	13.96 ± 2.90	11.36 ± 0.35	10.33 ± 0.65
	Atretic	11.50 ± 2.80	11.28 ± 0.86	10.58 ± 1.59
Luteal	Normal	*16.24 ± 1.15	11.12 ± 1.49	—
	Atretic	** 8.28 ± 0.53	**12.39 ± 0.86	—

Mean ± SE(μ mole *p*-NP/mg protein/min.), n=5
Significancy of follicle size: *; p<0.05, **; p<0.01
state: *; p<0.05, **; p<0.01

Table 2. Alkaline phosphatase activity of theca layer according to the follicle size, the phase of ovarian cycle and the follicle state in the porcine ovary

Phase of ovarian cycle	Follicle state	Follicle size(diameter)		
		Small (3.5mm <)	Medium (4-6mm)	Large (7mm >)
Follicular	Normal	142.31 ± 8.04	**50.56 ± 4.36	**26.23 ± 4.10
	Atretic	**84.61 ± 7.85	*55.44 ± 5.90	**28.96 ± 4.06
Luteal	Normal	*105.03 ± 14.71	*68.08 ± 3.74	—
	Atretic	*113.70 ± 5.75	**64.54 ± 6.94	—

Mean ± SE(μ mole *p*-NP/mg protein/min.), n=5
Significancy of follicle size: *; p<0.05, **; p<0.01
cyclic phase: *; p<0.05, **; p<0.01
state: *; p<0.05, **; p<0.01

도를 측정하였다. 조직내 단백질은 Lowry(1951)등의 방법에 따라 bovine serum albumin(BSA, Sigma)를 표준단백질로 삼아 파장 540nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 측정된 효소의 활성도(μ mole *p*-NP/mg protein/min.)에 대한 유의성 검정은 Student's *t*-test로 하였으며 $p < 0.05$ 를 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 효소활성 부위

난포기의 경우 난포내 과립세포에서의 효소활성 정도는 대난포보다 소난포에서 약간 강한 활성을 보였으나 매우 미약하였다(Plate I-1, 2, 3, 4; Plate II-3, 4). 난포의 상태에 따라서 차이는 보이지 않았으나 ALPase는 폐쇄 중난포에서 약한 활성도를 보였으나(Plate I-2, 4) ATPase는 거의 활성이 나타나지 않았다(Plate II-1, 2). 난포막내층에서는 난포의 크기 및 난포의 상태와 관계없이 ALPase의 활성도는 매우 강한 활성을 보였고(Plate I-1, 2, 3, 4), ATPase는 정상

군과 폐쇄군의 중난포에서는 난포막층에 약한 활성을 보였으며, 소난포에서는 정상군에서만 과립세포와 접한 부위에서 활성을 보였다(Plate II-1, 2, 3, 4).

황체기의 경우, 난포내 과립세포에서의 효소 활성 정도는 ALPase는 대난포보다 소난포에서 약간 강하였으나 대체로 미약하였다(Plate I-1, 2, 3, 4). ATPase는 정상 중난포에서는 희미하게 나타났으나 소난포에서는 조금 진하게 관찰되었다(Plate II-5, 7). 폐쇄 중난포에서는 약한 활성을 나타내었고 폐쇄 소난포에서는 강소대로 부유되어 있는 일부 과립세포에서 강한 활성을 보였다(Plate II-6, 8). 난포막층은 난포기보다는 조금 약하나 역시 강한 활성을 보였다(Plate I-5, 6, 7, 8). ALPase는 난소의 주기 및 난포의 상태, 그리고 난포의 크기에 무관하였다. ATPase는 난포기와는 달리 크기 및 난포의 상태와 무관하게 모두 약한 활성을 나타내었다(Plate II-5, 6, 7, 8).

2. 효소활성도

Table 3. Adenosine triphosphatase activity of the granulosa cells according to the follicle size, the phase of ovarian cycle and the follicle state in the porcine ovary

Phase of ovarian cycle	Follicle state	Follicle size(diameter)		
		Small (3.5mm <)	Medium (4-6mm)	Large (7mm >)
Follicular	Normal	16.11 ± 2.09	*10.85 ± 0.74	**8.31 ± 0.54
	Atretic	13.90 ± 0.85	**9.23 ± 0.55	*10.07 ± 0.84
Luteal	Normal	16.96 ± 1.23	**.*3.86 ± 0.17	—
	Atretic	*17.26 ± 1.75	**.*9.39 ± 1.65	—

Mean ± SE(μ mole *p*-NP/mg protein/min), n=5

Significancy of follicle size; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

cyclic phase; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

state; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

Table 4. Adenosine triphosphatase activity of theca layer according to the follicle size, the phase of ovarian cycle and the follicle state in the porcine ovary

Phase of ovarian cycle	Follicle state	Follicle size(diameter)		
		Small (3.5mm <)	Medium (4-6mm)	Large (7mm >)
Follicular	Normal	15.28 ± 0.51	**7.40 ± 0.78	**4.16 ± 0.39
	Atretic	**10.92 ± 0.93	**6.10 ± 0.46	*3.54 ± 0.18
Luteal	Normal	**10.53 ± 1.34	8.11 ± 0.42	—
	Atretic	13.19 ± 1.10	*7.49 ± 0.71	—

Mean ± SE(μ mole *p*-NP/mg protein/min), n=5

Significancy of follicle size: * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

cyclic phase: * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

state : * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

고 찰

과립세포와 난포막층에서 phosphatase의 활성화도(μ mole *p*-NP/mg protein/min.)를 측정된 결과는 각각 표 1, 2, 3, 4과 같다. 과립세포의 ALPase는 표 1에서 보는 바와 같이 난포기의 대, 중, 소난포에서 난포의 상태간의 차이는 폐쇄군이 정상군보다 다소 낮았으나 유의성은 없었다. 난포의 크기간의 차이도 유의성은 없었으나 난포가 커짐에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 황체기의 소난포에서 정상군의 활성화도(16.24)는 폐쇄군(8.28)보다 2배로 높았다($p < 0.01$).

난포막층의 ALPase는 표 2에서 보는 바와 같이 난포기에서 난포가 커짐에 따라 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다. 폐쇄군의 대, 중난포에서 다소 높았으나 유의하지 않고 소난포에서는 유의하게($p < 0.01$) 낮았다. 황체기에서 중난포의 활성화도는 난포기의 그것에 비하여 유의하게 높았으나 소난포에서는 오히려 반대의 경향을 보였으며 황체기 역시 난포기와 같이 난포가 커짐에 따라 감소하였다. 난포의 상태에 따른 차이에는 유의성이 없었다.

과립세포의 ATPase는 표 3에서 보는 바와 같이 난포기에서 소난포와 중난포의 난포 상태간의 차이는 각각 16.11:13.90, 10.85:9.23으로 폐쇄난포가 조금 낮은 경향을 보였으나 유의성이 없었다. 그러나 대난포에서는 오히려 8.31:10.07로 폐쇄난포에서 높은 경향을 보였다. 난포의 크기가 커짐에 따라 정상난포에서는 유의하게($p < 0.05$) 감소하였으며 폐쇄난포에서는 이러한 현상이 보이지 않았다. 황체기에서는 난포기와는 달리 난포의 크기가 커짐에 따라 활성화도는 정상난포 및 폐쇄난포 모두 현저히($p < 0.01$) 감소하였다. 난포의 상태간의 차이는 중난포에서 각각 3.86:9.39로써 폐쇄난포의 활성화도가 정상난포의 그것에 비하여 유의하게($p < 0.05$) 높았으나 소난포에서는 이러한 경향이 보이지 않았다. 난포막층의 경우는 표 4에서 보는 바와 같이 난포기에서는 유의성은 없으나 일반적으로 폐쇄난포의 활성화도가 정상난포의 그것에 비하여 낮은 경향을 나타내었다. 난포의 크기간의 상관관계는 유의하게($p < 0.01$) 감소하는 양상을 나타내었다. 황체기의 난포는 난포기와는 달리 폐쇄소난포의 활성화도는 정상군에 비하여 오히려 높은 경향을 나타내었다. 난포의 크기간의 관계는 정상군에서 일반적으로 난포의 크기가 커짐에 따라 감소하는 경향을 보였고, 폐쇄군에서는 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다.

세포내로 스테로이드호르몬이나 물질의 유입에는 막에 있는 ALPase와 ATPase가 관여한다고 알려져 왔다(Bowers & McComb, 1975; Tokumitsu & Fishman, 1983). 난포기에서 주로 난포막내층에 활성화정도가 강한 ALPase, 약한 ATPase가 존재하였는데 난포의 성숙에 이호소들의 연관성이 있음을 암시하는 것으로써 강소가 형성되어 난포가 커질 때에는 난포세포의 분비물질 이외에 혈액으로부터 물질이 능동수송되어 유입된다는 보고(Edward, 1974; Anderson et al., 1976)와 상응하는 것으로 추측된다.

소난포에서 난포막내층의 ATPase 활성화도는 강한 반면 대난포에서 약하였는데 난포의 성숙과 동시에 체액이 유입된다는 Kim(1983)의 보고와 일치하는 것으로 난포가 성숙을 시작할 때 특히 강소가 형성되면서 혈액으로부터 물질의 유입이 활발히 일어난다고 사료되며 또한 난포가 성숙함에 따라 물질 유입이 점차 감소하는 것으로 생각된다.

황체기의 경우 난포기와 같은 양상이었는데 효소의 활성화는 과립세포와 난포막세포에서 난포의 크기가 커짐에 따라 감소하여 효소의 활성화 시기는 소난포의 시기에서 활발하다가 대난포에서는 약하게 활성화도가 감소하는 것으로 사료된다. 따라서 물질대사는 소난포에서 가장 활발하게 일어나다가 강소가 형성됨에 따라 점차 물질대사가 감소되는 것으로 추측된다. 황체기에서 난포막층의 이 두 효소의 활성화도는 난포기에 비하여 정상소난포에서는 낮고 폐쇄소난포에서는 높았고, 중난포에서는 모두 높은 경우를 보였는데 이는 황체가 형성됨에 따른 호르몬의 영향이라 사료되지만 증거는 불확실하다(Guraya, 1985). 난포의 성장과 관련하여 중난포의 활성화도가 소난포에 비하여 낮은 양상을 보인 것은 소난포와는 달리 호르몬의 영향이 빠르지 않음을 시사한다. 난포의 성장과 발정주기에 따라 유의한 차이는 없었으나 ALPase가 강소의 형성에 간접적인 영향을 주는 것으로 추측할 수 있었다.

Graafian 난포는 치밀하게 겹쳐 있는 난포막층에 싸여 있고 그 내층은 세포간격이 성근 과립세포와 방사관세포로 되어 있으며, 그 사이에 난포액으로 채워져서 강소가 형성되어 있는 조직학적 구조와, 난포액은 혈액에 비하여 특정한 이온과 용질등이 고농도로 존재한다(Edward,

1974)는 분석의 결과로 보아 난포액은 능동수송에 의하여 농도가 유지되고 있음을 짐작할 수 있다. 본 실험에서 난포막층에 매우 강한 ALPase의 활성을 보였는데, 이는 ALPase가 스테로이드 합성에 참여하여 estrogen의 분비를 촉진한다(Grob, 1969; Kruip & Brand, 1975)는 보고와 연관성이 있음을 짐작할 수 있으며 또한 물질대사에 직접적 혹은 간접적으로 이 효소가 작용하고 있음을 알 수 있다.

난포기에서 폐쇄난포와 정상난포의 과립세포는 이들 효소의 활성도가 강하였으나 큰 차이가 없었으므로 폐쇄의 증거로 이용할 수는 없으나 폐쇄난포의 난포막층이 강한 활성을 나타내었다. 폐쇄난포액내에 혈청에 포함되는 단백질이 존재한다는 보고(Kim et al., 1986)에 비추어 보아, 이 부위의 효소활성은 혈액내 물질의 난포강으로의 유입과 밀접한 관계가 있음을 짐작할 수 있으며, 난포막층에 이들 효소의 활성도가 강하게 나타난다(Kim, 1983)는 것으로 보아 난포막층의 체액에 대한 수송능력이 커지는 것으로 사료된다.

황체기에서 ALPase 활성도가 정상난포보다 폐쇄난포의 과립세포에서 강하다는 보고(Ryan, 1980; Guraya, 1985)가 있었으나 본 실험에서 소여포에서는 낮고 중여포에서는 높은 활성도를 보였다. 이는 난포의 상태가 다양하며 종의 특이성 때문에 서로 상이한 결과를 보이지 않았으나 사료된다. 난포막층에서는 난포기와는 달리 정상소난포에 비하여 폐쇄소난포에서 높은 활성도를 보였는데, 폐쇄난포에서 ATPase와 ALPase의 활성도가 높다는 보고(Adams et al., 1966, Weir & Rowlands, 1977)는 난소의 주기와 난포의 크기에 관하여는 논급하지 않았으므로 재고되어야 할 것이다.

결 론

돼지 난포내 alkaline phosphatase(ALPase) 및 adenosine triphosphatase(ATPase)의 활성부위와 활성도가 난포의 성장 및 성숙에 어떻게 관여하는지를 알아보기 위하여 과립세포와 난포막층을 분리한 후 조직화학적 방법으로 관찰하고 활성도를 측정하였다. 난포막층에서는 대난포보다 소난포에서 ALPase와 ATPase의 활성이 강하였다. 이로 보아 난포의 성장과정에서 강소형성은 난포막층에 존재하는 ALPase와 ATPase의 활성에 의하여 물질유입이 활발하게 되고, 따라

서 체액이 누적된 결과로 사료된다. 또한 난포기와는 달리 황체기에서 난포막내층의 이 효소들의 활성도가 정상군에서는 낮고 폐쇄군에서는 높게 나타났다. 이는 난포의 폐쇄기작과 성숙기작이 난소주기에 따라 다르다는 것을 의미한다.

인 용 문 헌

- Adams EC, Hertig AT, Foster S: Studies on guinea pig oocytes. II. Histochemical observations on some phosphatases lipid in developing and in atretic oocytes and follicles. *Am J Anat* 1966, 119, 303-339.
- Amin H, Richart FRM, Brinson AV: Preovulatory granulosa cells and steroidogenesis. An ultrastructural study in the Rhesus monkey. *Obstet Gynecol* 1976, 47, 562-568.
- Anderson MM, Kroll J, Byskov AG, Faber M: Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J Reprod Fert* 1976, 48, 109-118.
- Bowers Jr. GN, McComb RB: Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1975, 21, 1988-1995.
- Channing CP, Kammerman S: Characteristics of gonadotropin receptors of porcine granulosa cells during follicle maturation. *Endocrinology* 1974, 37, 189-219.
- Ernst SA: Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. I. Biochemical characterization of a cytochemical medium for the ultrastructural localization of ouabaine-sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in the avian salt gland. *J Histochem Cytochem* 1972, 13-22.
- Gomori G: Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathological conditions. *Arch Pathol* 1941, 32, 189-199.
- Grob HS: Growth and endocrine function of isolated ovarian follicles cultivated *in vitro*. *Biol Reprod* 1969, 1, 320-323.
- Guraya SS: Follicular atresia. In: Guraya. SS, ed. *Biology of ovarian follicles in mammals*. Berlin: Springer-Verlag Press, 1985, 227-275.

- Kim JH, Yoo Y-D, Kim MK : A study on the pattern of proteins on electrophoresis in the porcine follicular fluid during atresia. *Kor J Fertil Steril* 1986, 13, 39-51.
- Kim MK : Effect of PMSG on ATPase in mouse ovary. *J Basic Sci Hanyang Univ* 1983, 2, 147-153.
- Kim MK, Kim HT : Effect of PMSG on ATPase activity in the immature mouse ovary. *J Basic Sci Hanyang Univ* 1983, 2, 155-161.
- Kim MK, Lee YH, Kim JH, Yoon Y-D : A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia. *Kor J Zool* 1987, 30, 351-370.
- Kruip AM, Brand A : Follicular growth during the normal cycle and after treatment with progestagens in the ewe. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 1975, 23, 191-202.
- Lowry OH, Rosebrouch NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193, 265-275.
- Matta P, Blerkom V : A scanning electron microscopic complex. I. Follicle and oocyte. *J Submicro Cytol* 1974, 6, 297-301.
- Parr EL : Histological examination of the rat ovarian follicle wall prior to ovulation. *Biol Reprod* 1974, 11, 483-503.
- Richards JS : Maturation of ovarian follicles : Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 1980, 60, 51-89.
- Ryan RJ : Follicular atresia : Some speculation of biochemical markers and mechanisms. In : Schwartz NB, Dunn MH, eds. *Dynamics of ovarian function*. New York : Raven Press Inc. 1980, 1-11.
- Tokumitsu S-I, Fishman WH : Alkaline phosphatase biosynthesis in the endoplasmic reticulum and its transport through the Golgi apparatus to the plasma membrane : Cytochemical evidence. *J Histochem Cytochem* 1983, 31, 647-655.
- Tsafriiri A, Braw RH : Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxford Review Reprod Biol* 1984, 226-265.
- Weir BJ, Rowlands W : Ovulation and atresia. In : Zuckerman L, Weir BJ eds. *The ovary*. New York : Academic Press, 1977, 1, 265-301.

EXPLANATION OF PLATES

Plate I. Microphotographs of alkaline phosphatase localization in the porcine ovarian follicles. A : antrum, without staining ($\times 320$).

1. An alkaline phosphatase localization in a normal medium follicle at the follicular phase, showing very strong activity on theca interna.
2. An alkaline phosphatase localization in an atretic medium follicle at the follicular phase, showing strong activity on granulosa cells and theca interna.
3. An alkaline phosphatase localization in a normal small follicle at the follicular phase, showing on theca interna.
4. An alkaline phosphatase localization in an atretic small follicle at the follicular phase, showing strong activity on theca interna.
5. An alkaline phosphatase localization in a normal medium follicle at the luteal phase, showing strong activity on theca interna.
6. An alkaline phosphatase localization in an atretic medium follicle at the luteal phase, showing strong activity on theca interna.
7. An alkaline phosphatase localization in a normal small follicle at the luteal phase, showing strong activity on theca interna.
8. An alkaline phosphatase localization in an atretic small follicle at the luteal phase, showing strong activity on theca interna.

Plate II. Microphotographs of adenosine triphosphatase localization the porcine ovarian follicles. A : antrum, without staining ($\times 320$).

1. An adenosine triphosphatase localization in a normal medium follicle at the follicular phase, showing moderate activity on granulosa cells and theca layer.
2. An adenosine triphosphatase localization in an atretic medium follicle at the follicular phase, showing weak activity on granulosa cells and moderate activity on theca interna.
3. An adenosine triphosphatase localization in a normal small follicle at the follicular phase, showing slightly weak activity on granulosa cells and moderate activity on membrana granulosa.
4. An adenosine triphosphatase localization in an atretic small follicle at the follicular phase, showing weak activity on granulosa cells and theca layer.
5. An adenosine triphosphatase localization in a normal medium follicle at the luteal phase, showing slightly weak activity on granulosa cells and theca interna.
6. An adenosine triphosphatase localization in an atretic medium follicle at the luteal phase, showing moderate activity on granulosa cells and theca layer.
7. An adenosine triphosphatase localization in a normal small follicle at the luteal phase, showing strong activity on granulosa cells and theca layer.
8. An adenosine triphosphatase localization in an atretic small follicle at the luteal phase, showing strong activity on granulosa cells and weak activity on theca interna.

Plate I

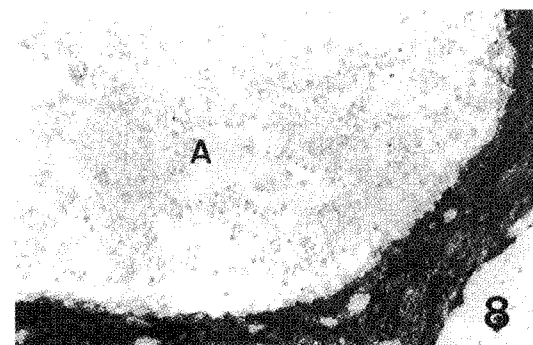
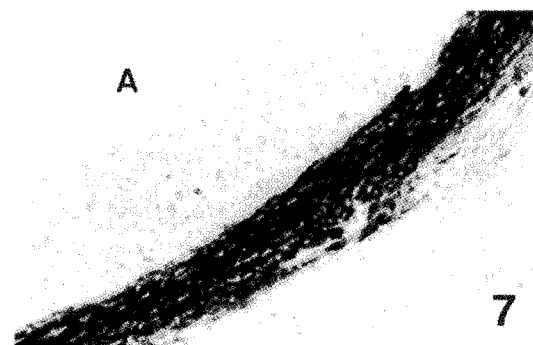
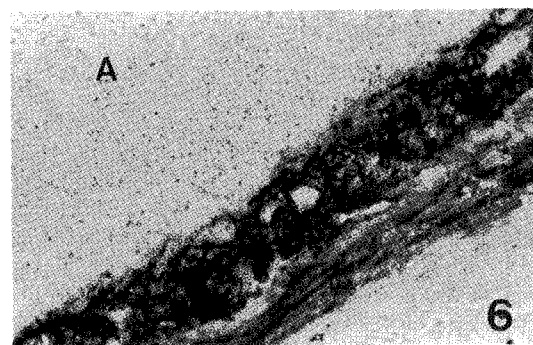
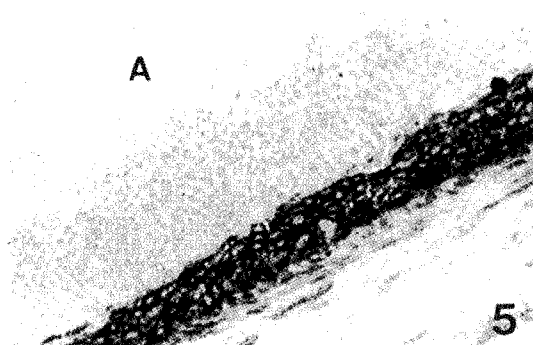
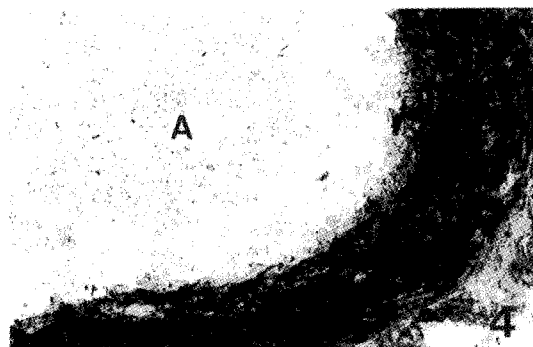
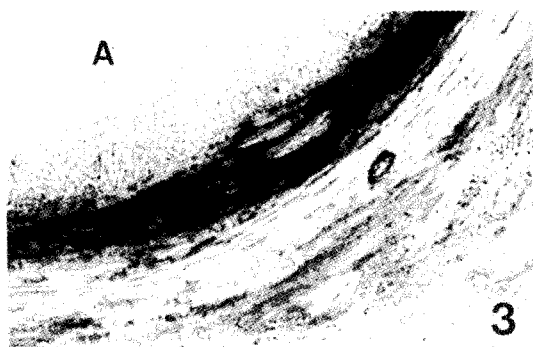
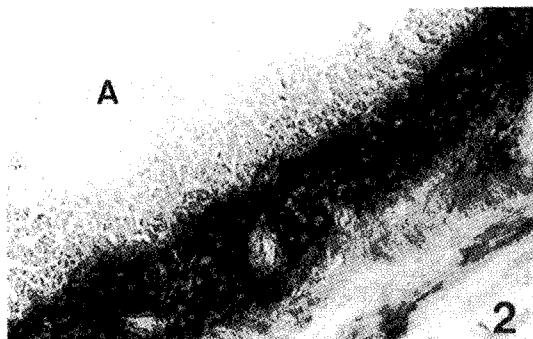


Plate II

