

voltooiing van de eerste rijpingsdeling

in de eicel van de rat

Proefschrift

ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde  
aan de Erasmus Universiteit te Rotterdam

op gezag van de Rector Magnificus Prof. Dr. P.W. Klein  
en volgens besluit van het college van dekanen.

De openbare verdediging zal plaatsvinden op  
woensdag 30 oktober 1974 des namiddags te 4.15 uur door

Jan Pieter Willem Vermeiden

geboren te Utrecht

1974

Bronder-offset B.V. Rotterdam

PROMOTOR : DR. G.H. ZEILMAKER

CO-REFERENTEN: PROF. DR. J.J. VAN DER WERFF TEN BOSCH  
PROF. DR. D. BOOTSMA

Dit onderzoek werd verricht in de afdeling Endocrinologie,  
Groei en Voortplanting van de Faculteit der Geneeskunde,  
Erasmus Universiteit Rotterdam.

*Aan Jaapje en Froukje  
Aan Mineke en Dirk-Jan*



## INHOUD

	Blz
Hoofdstuk 1. INLEIDING	1
Hoofdstuk 2. DE EICEL	4
2.1. Beknopt overzicht van de ontwikkeling van de eicel	4
2.2. Oerkiemcellen	7
2.3. Profase van de eerste rijpingsdeling	10
2.4. Primordiale follikels	15
2.5. Follikelontwikkeling en follikelatresie	17
2.6. De rustende oöcyt	22
2.7. De groeiende oöcyt	25
2.7.1. Zona pellucida	30
2.7.1.1. Herkomst van de zona pellucida	32
2.7.2. Opname en synthese van voedings- en bouwstoffen tijdens de groeifase van de oöcyt	33
2.7.3. Non-membraneuze cytoplasmatische lamellen	36
2.8. De volgroeide oöcyt	39
2.8.1. De oöcyt in de periode tussen het einde van de groeifase en de hervatting van de eerste rijpingsdeling	40
2.8.2. De voltooiing van de eerste rijpingsdeling	42
2.8.3. Bevruchting en tweede rijpingsdeling	43
2.8.4. Mitochondriën	46
2.9. Oögenese en spermatogenese	48
2.10. Atresie van kiemcellen	51
Hoofdstuk 3. INLEIDING EXPERIMENTEEL GEDEELTE	56
Hoofdstuk 4. MORFOLOGIE VAN DE RIJPINGSDELING	61
4.1. Inleiding	61
4.2. Materiaal en methode	62
4.3. Resultaten	62
4.3.1. Kiemblaasstadium	62
4.3.2. Chromatinemassa-I-stadium	63
4.3.3. Diakinese-stadium	63

4.3.4.	Metafase-I-stadium	64
4.3.5.	Anafase-stadium	65
4.3.6.	Telofase-stadium	66
4.3.7.	Chromatinemassa-II-stadium	66
4.3.8.	Metafase-II-stadium	66
4.4.	Discussie	67
Hoofdstuk 5. TIJDSHEMA VAN DE EERSTE RIJPINGSDELING		75
5.1.	Inleiding	75
5.2.	Materiaal en methode	76
5.2.1.	Proefdieren	76
5.2.2.	Gonadotrope stimulatie	77
5.2.2.1.	Ruw hypofyse extract	77
5.2.2.2.	Elektrochemische stimulatie	78
5.2.2.3.	Blokkade van spontane afgifte van endogene ovulatoire hormonen	78
5.2.3.	Histologische methode, microscopie en fotografie	78
5.3.	Resultaten	79
5.3.1.	Het verloop van het tijdschema van de eerste rijpingsdeling na inductie met verschillen- de gonadotrope stimuli	79
5.3.2.	Het verloop van de eerste rijpingsdeling na inductie op twee verschillende tijd- stippen van de dag van pro-oestrus	81
5.3.3.	Het effect van een sub-ovulatoire dosis gonadotrope hormonen op de rijpingsdeling	82
5.4.	Discussie	84
Hoofdstuk 6. OOCYTRIJPING, LUTEINISATIE EN OVULATIE		88
6.1.	Inleiding	88
6.2.	Materiaal en methode	88
6.3.	Resultaten	89
6.3.1.	Luteïnisatie	89
6.3.2.	Oöcytrijping, luteïnisatie en ovulatie bij met HCG behandelde cyclische ratten	91
6.3.3.	Met hypofyse-extract behandelde cyclische ratten	93

6.3.4.	Met hypofyse-extract behandelde neonataal met androgeen gesteriliseerde dieren	94
6.4.	Discussie	99
Hoofdstuk 7. ATRESIE VAN PRE-OVULATOIRE FOLLIKELS		103
7.1.	Inleiding	103
7.2.	Materiaal en methode	106
7.3.	Resultaten	106
7.4.	Discussie	109
Hoofdstuk 8. STEROIDEN EN DE INDUCTIE VAN OOCYT-RIJPING		112
8.1.	Inleiding	112
8.2.	Materiaal en methode	113
8.3.	Resultaten	115
8.3.1.	De invloed van cyanoketon op oöcytrijping en follikelsprong	115
8.3.2.	De invloed van aminoglutethimidefosfaat op de rijpingsdeling	116
8.4.	Discussie	125
Hoofdstuk 9. SAMENVATTING EN CONCLUSIES VAN HET EXPERIMENTELE GEDEELTE		129
Summary		131
Litteratuur		133
Curriculum vitae		141





## Hoofdstuk 1. Inleiding.

De vorming van voortplantingscellen vindt bij meer-cellige organismen meestal in speciaal daartoe ingerichte organen, gonaden, plaats. Voortplantingscellen ontstaan bij vrouwelijke zoogdieren uitsluitend in de embryonale-postnatale periode. Na deze periode bevat de vrouwelijke zoogdiergonade een groot aantal rustende voortplantingscellen waarvan er voortdurend een aantal door nog onbekende oorzaak met de ontwikkeling tot bevruchtbare, rijpe eicel begint. De rijpe eicel kan na bevruchting aanleiding geven tot een embryonale ontwikkeling, hetwelk uiteindelijk kan resulteren in een nieuw volwassen individu, dat op zijn beurt weer voortplantingscellen kan vormen. Het vermogen een embryonale ontwikkeling aan te vangen is het resultaat van een gecompliceerd ontwikkelingsproces, waarvan een gedeelte in dit proefschrift nader bekeken wordt.

De rustende voortplantingscel wordt omgeven door een dunne laag cellen die tijdens de ontwikkeling tot rijpe eicel uitgroeit tot een blazige met vloeistof gevulde follikel. Na het laatste differentiatieproces, de voltooiing van de eerste rijpingsdeling, komt de eicel vrij. De follikel springt en de rijpe eicel komt buiten de gonade terecht waar bevruchting en embryonale ontwikkeling plaats kunnen vinden.

Veel van het ontwikkelingsproces tot rijpe, bevruchtbare eicel is nog onbekend. Het is dan ook niet verwonderlijk dat op velerlei wijzen geprobeerd wordt dit ontwikkelingsproces te beschrijven. Getracht wordt om *in vitro* in een kunstmatig milieu de ontwikkeling tot rijpe eicel, bevruchting en eerste stadia van embryonale ontwikkeling te doen plaatsvinden. Is dit eenmaal mogelijk, dan kan dit op veterinair gebied van grote betekenis worden. Op snelle wijze is dan bijvoorbeeld door trans-

plantatie van *in vitro* bevruchte eicellen van een goed veeras in gast-moederdieren van een minder ras verbetering van het veebestand mogelijk. Op beperkte schaal vindt reeds transplantatie van embryonen in een vroeg ontwikkelingsstadium plaats bij runderen, waarbij de embryonale ontwikkeling in het ontvangende rund wordt voltooid.

Het *in vitro* doen plaatsvinden van rijping, bevruchting en eerste stadia van embryonale ontwikkeling lukt, ondanks vele pogingen, slecht bij menselijke eicellen. Op korte termijn is er van deze techniek nog niet veel te verwachten bij de bestrijding van menselijke onvruchtbaarheid.

Een verstoring van de tijdsrelatie tussen de voltooiing van de eerste rijpingsdeling, het vrijkomen van de eicel en de bevruchting, kan een gestoorde embryonale ontwikkeling tot gevolg hebben (Fugo en Butcher 1966, Rodman 1971). Een groot percentage van de spontane abortussen bij de mens kan hierop teruggevoerd worden (Guerrero en Lanctot 1970).

Kennis van de wijze waarop rijping van de eicel en follikelsprong verlopen, van de wijze waarop deze processen geïnduceerd worden en van de relaties tussen eirijping en follikelsprong met andere processen die zich in de vrouwelijke gonade afspelen, kan van groot belang zijn bij de behandeling van onvruchtbaarheid en de preventie van gestoorde embryonale ontwikkelingen.

Op de afdeling waar dit onderzoek verricht is, wordt veel onderzoek gedaan met eicellen *in vitro*. De resultaten van *in vitro* en *in vivo* onderzoek kunnen elkaar aanvullen en samen inzicht geven in de processen welke zich gedurende de rijping van de eicel afspelen. Om deze reden werd de eicel, de voltooiing van de eerste rijpingsdeling en de follikel, waarin de eicel zich bevindt, nader bestudeerd. Dit is gedaan door middel van literatuurstudie en door middel van experimenteel werk. In de literatuurstudie

wordt de ontwikkelingsgeschiedenis van eicel en follikel beschreven. In het experimentele werk is de meeste aandacht gevestigd op de voltooiing van de eerste rijpingsdeling en de relatie hiervan met andere processen die zich gelijktijdig in de vrouwelijke gonade afspelen.

## Hoofdstuk 2. De eicel.<sup>1)</sup>

### 2.1. Beknopt overzicht van de ontwikkeling van de eicel.

Een verzamelnaam voor alle typen mannelijke en vrouwelijke geslachtscellen is kiemcel. In het ontwikkelingsproces van de kiemcel zijn twee perioden te onderscheiden: een embryonale periode, waarin de kiemcel ontstaat en een periode tijdens de volwassenheid van het dier, waarin de kiemcel zich ontwikkelt tot eicel of zaadcel.

Het begin van de embryonale ontwikkeling van de kiemcellen verloopt bij beide geslachten op dezelfde wijze. De eerste herkenbare geslachtscellen, oerkiemcellen, bevinden zich in de wand van de dooierzak. Vandaar vindt migratie naar het gonadegebied plaats. Het aantal oerkiemcellen dat in de dooierzakwand ontstaat is gering maar tijdens de migratie neemt het aantal door celdeling sterk toe. Na aankomst van de oerkiemcellen in het gonadegebied begint dit met de ontwikkeling tot gonade. Na enkele dagen is reeds te zien of de gonade-aanleg een ovarium of een testikel wordt. De oerkiemcellen, die zich in een toekomstig ovarium bevinden, worden oögonia genoemd; de oerkiemcellen in een toekomstige testikel pre-spermatogonia. Door celdeling neemt het aantal oögonia sterk toe. Na enige tijd, bij de rat ongeveer op de zeventiende dag *post conceptum*, stoppen de oögoniale delingen, nadat een begin gemaakt is met de volgende celdeling

<sup>1)</sup> De elektronenmicroscopische foto's die in dit hoofdstuk zijn opgenomen, zijn gemaakt van coupes van ovaria van 22 dagen oude RxU ratten. De opnamen werden gemaakt op de elektronenmicroscop van de afdeling anatomie.

Leeftijd embryo in dagen <i>post conceptum</i>	ontwikkelingsstadium kiemcel
10 - 11	Migratie oerkiemcel van wand dooierzak naar toekomstig gonadegebied.
14	Onderscheid tussen toekomstig ovarium en toekomstige testikel mogelijk, oerkiemcellen → oögonia.
17	einde oögoniale delingen
17 - 24	Profase eerste rijpingsdeling, oögonia → primaire oöcyt. Dag 21 dag van de geboorte.
Leeftijd rat in dagen na de geboorte	
Vanaf de tweede dag tot de dood van de rat	Rustende primaire oöcyten } groeïende primaire oöcyten } in dictyoteen
Vanaf de 36 <sup>ste</sup> dag	Eerste ovulatie. Voltooiing eerste rijpings- deling, afsnoering eerste poollichaampje, primaire oöcyt → secundaire oöcyt, follikelsprong. Secundaire oöcyt komt in de eileider, bevruchting en afsnoering tweede poollichaampje.

Figuur 2-1. Overzicht van de ontwikkeling van de kiemcel bij de vrouwelijke rat. Referenties: McAlpine 1955, Beaumont en Mandl 1962. Voor een overzicht van andere soorten, zie Peters 1971 en Baker 1972a.

(2.2 en 2.9). Deze volgende celdeling is geheel anders van aard dan de voorafgaande en wordt eerste rijpingsdeling genoemd.

In de kernen van de oögonia condenseren de chromosomen. Deze worden zichtbaar als dunne chromatinedraden, die vervolgens kort en dik worden. Er vindt paring van de homologe chromosomen plaats waardoor uitwisseling van genetisch materiaal tussen de homologe chromosomen mogelijk is. De rijpingsdeling wordt niet voortgezet en de chromosomen worden diffuus. De kern van de kiemcel krijgt weer het uiterlijk als tijdens een interfase, de fase tussen twee celdelingen. De eerste stadia van de profase van de eerste rijpingsdeling zijn voltooid (2.3). Bij de rat is dit het geval omstreeks de geboorte. Zodra in een oögonium de verschijnselen van de eerste rijpingsdeling zichtbaar zijn, spreekt men van een primaire oöcyt.

Cellen, die van het ovariumepitheel afkomstig zijn, omgeven de oöcyt met een al dan niet gesloten laag platte cellen. Samen met de oöcyt vormen ze een primordiale follikel (2.4). Direct na hun ontstaan zijn er reeds primordiale follikels die met hun ontwikkeling beginnen (2.5). Bij vrouwelijke zoogdieren vindt nieuwvorming van kiemcellen na de embryonale periode niet meer plaats. Bij haar is follikelontwikkeling mogelijk zolang er primordiale follikels zijn. De voorraad primordiale follikels is bij de mens ongeveer rondom het vijftigste levensjaar uitgeput (2.10).

De oöcyt van de primordiale follikel, de rustende oöcyt, is ongeveer  $12\mu$  in diameter (2.6). Deze diameter neemt tijdens de follikelontwikkeling toe tot ongeveer  $70\mu$  (groeifase van de oöcyt, 2.7).

De zich ontwikkelende follikel wordt steeds groter en vormt een centrale holte (antrum). Bij de volwassen rat kan door endogene afgifte van een ovulatoire hoeveel-

heid gonadotrope hormonen de follikel springen waardoor de oöcyt vrijkomt (ovulatie). Dezelfde stimulus die de follikelsprong induceert heeft de hervatting van de eerste rijpingsdeling tot gevolg. Er vindt opnieuw condensatie van de chromosomen plaats. De nog gedeeltelijk aan elkaar vastzittende homologe chromosomen worden van elkaar gescheiden. De helft van het aantal homologe chromosomen blijft in de oöcyt, de andere helft gaat naar het poollichaampje, het delingsproduct van de eerste rijpingsdeling. Na afsnoering van het eerste poollichaampje ontstaat in het cytoplasma van de oöcyt een kernspoel, waarin de overgebleven chromosomen zich in een metafaseplaat rangschikken. Zonder interfase is de oöcyt van de telofase van de eerste rijpingsdeling overgegaan naar de metafase van de tweede rijpingsdeling (2.8, 2.8.2). In dit stadium vindt bij de meeste zoogdieren de follikelsprong plaats. De oöcyt komt in de eileider en snoert, indien bevruchting optreedt, het tweede poollichaampje af. De splitsing van de twee chromatiden, die reeds aanwezig was wordt zichtbaar. De chromatiden gaan uit elkaar, per chromosoom blijft er één chromatide in de oöcyt en komt er één in het tweede poollichaampje terecht. De in de oöcyt achtergebleven chromatiden vormen een pronucleus. Evenzo doet de kop van de binnengedrongen zaadcel. De twee pronucleï gaan dicht tegen elkaar aanliggen, waarna de membranen van de pronucleï verdwijnen. De bevruchting is een feit (2.8.3).

## 2.2. Oerkiemcellen.

In de wand van de dooierzak van de muis bevinden zich op de achtste dag (Chiquoine 1954) post conceptum cellen, die in vergelijking met de hen omringende cellen groter zijn en een grotere kern hebben. Het cytoplasma van deze

cellen kleurt zwak of in 't geheel niet. Hun kern- en celmembranen kleuren echter duidelijk (Brambell 1956). Deze cellen migreren naar het toekomstige gonadegebied, dat gelegen is in de wand van een plooi tussen coeloomwand en de oernier. Deze cellen worden oerkiemcellen genoemd. Aangenomen wordt dat ze ontstaan in het entoderm, hoewel het mogelijk is dat zij, zoals het geval is bij de kikker (Blacker 1966), ontstaan voordat er scheiding heeft plaatsgevonden tussen meso- en entoderm.

Tijdens de migratie neemt het aantal oerkiemcellen door mitose sterk toe. De opvatting dat er geen mitose tijdens migratie plaatsvindt (Franchi et al 1962), wordt door een groot aantal waarnemingen tegengesproken (Chiquoine 1954, Mintz 1959, Chretien 1966, Jost en Prépin 1966, Witschi 1948, voor overzicht Hardisty 1967). Mogelijkheden voor migratie van oerkiemcellen zouden kunnen zijn (Brambell 1956): a. passief transport via het bloed (vogels), b. gerichte amoëboïde bewegingen en c. verschil in groeisnelheid van de verschillende weefsels waardoor de dooierzak en het gonadegebied bij elkaar komen te liggen. In een weefselkweek van ovaria van muizenembryonen van 9 tot 15 dagen post conceptum toonden Blandau et al (1963) met behulp van een vertraagd opgenomen film amoëboïde bewegingen van de kiemcellen aan. Odor en Blandau (1969b) toonden aan dat bij muizen de amoëboïde kenmerken van de kiemcellen van de twaalfde tot de veertiende dag verdwijnen. De migratie bij zoogdieren vinden waarschijnlijk plaats door amoëboïde bewegingen van de oerkiemcellen. Een verschil in groeisnelheid van de weefsels draagt er mogelijk eveneens toe bij dat de oerkiemcellen in het toekomstige gonadegebied terecht komen (Merchant en Zamboni 1972).

Er heeft verschil van mening bestaan over de route die de kiemcellen afleggen naar het gonadegebied (Chiquoine 1954) door verwarring met primitieve bloed- en andere embryonale cellen (Boyd en Hamilton 1955).



Witschi (1948) heeft zeer nauwkeurig de route, welke de kiemcellen bij de mens afleggen, beschreven. De discussie over oorsprong van en route die de kiemcellen afleggen werd gesloten toen bleek dat alkalisch fosfatase in de oerkiemcellen voorkwam. Dankzij de specifieke aantoonbaarheid van dit enzym kon de migratieroute, zoals deze door Witschi (1948) beschreven was, worden bevestigd (mens: McKay et al 1953, muis: Chiquoine 1954, Mintz en Russell 1955, 1957, rat: McAlpine 1955). De oerkiemcellen zijn bij de muis op de achtste dag *post conceptum*, vlak voor de aanvang van de migratie, aantoonbaar in de wand van de dooierzak. Zij gaan via de laterale en caudale gedeelten van de open middendarm, de steel van de allantoïs en de splanchnopleura van de einddarm naar het gonadegebied. De migratie is bij de muis op de 12de dag voltooid. Bij de muis zijn er op de achtste dag 100-150 oerkiemcellen aanwezig. Op de negende dag 400-500 en op de twaalfde dag zijn er ongeveer 5000 (Chiquoine 1954, Mintz en Russell 1957). Het kleinste aantal kiemcellen, dat op de achtste dag geteld is, bedraagt acht. Hieruit zou afgeleid kunnen worden dat de kiemcellen uit één of enkele cellen ontstaan (Mintz 1960). Bij de rat valt de migratieperiode omstreeks de 10de en de 11de dag *post conceptum* (McAlpine 1955). Na de aankomst van de oerkiemcellen in de gonade-aanleg vangt de ontwikkeling tot gonade aan. Zodra onderscheid tussen toekomstig ovarium en toekomstige testis mogelijk is, worden de oerkiemcellen oögonia respectievelijk pre-spermatogonia genoemd (Mintz 1959). De oerkiemcellen verliezen hun amoëboïde karakter en hun cytoplasma wordt steeds complexer (Odor en Blandau 1969b). Het differentiatieproces van amoëboïde oerkiemcel tot in de gonade gefixeerd oögonium kan bij de rat goed bestudeerd worden omdat de mitosen van de kiemcellen meer synchroon verlopen dan bij andere diersoorten. Met getritieerd thymidine is

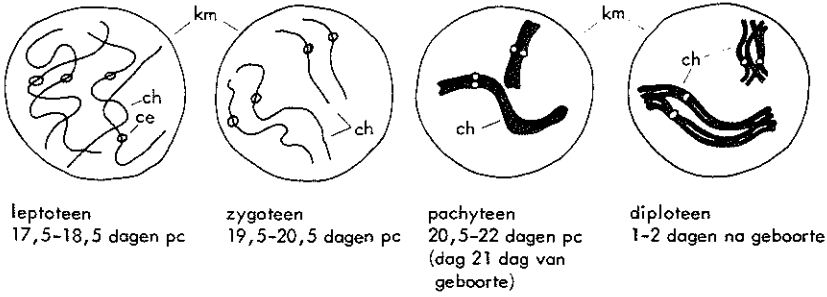
aan te tonen dat in rattekiemcellen vier golven van DNA-synthese zijn. Drie daarvan horen bij mitotische delingen, de vierde hoort bij de pre-profase van de eerste rijpingsdeling (Mauléon 1967, 1969).

Oögonia en de primaire oöcyten die daaruit ontstaan liggen in groepjes, zogenaamde einesten, bij elkaar (Peters 1971). De kiemcellen van een einest hebben onderling verbindingen (Franchi en Mandl 1962, Weakley 1966, Odor en Blandau 1969). De celdelingen zijn niet volledig; er blijft tussen de dochtercellen een protoplasmaverbinding bestaan. Een einest is aldus een soort syncytium en dit verklaart wellicht de synchrone ontwikkeling per einest. De protoplasmaverbindingen worden verbroken als follikelcellen de einesten binnengroeien. In de mannelijke gonade blijven syncytia gedurende de gehele fertiele levensfase bestaan. Spermatiden komen voor in groepjes van acht of zestien cellen. Ieder groepje vormt door intercellulaire verbindingen een syncytium (Fawcett et al 1959).

### 2.3. De profase van de eerste rijpingsdeling.

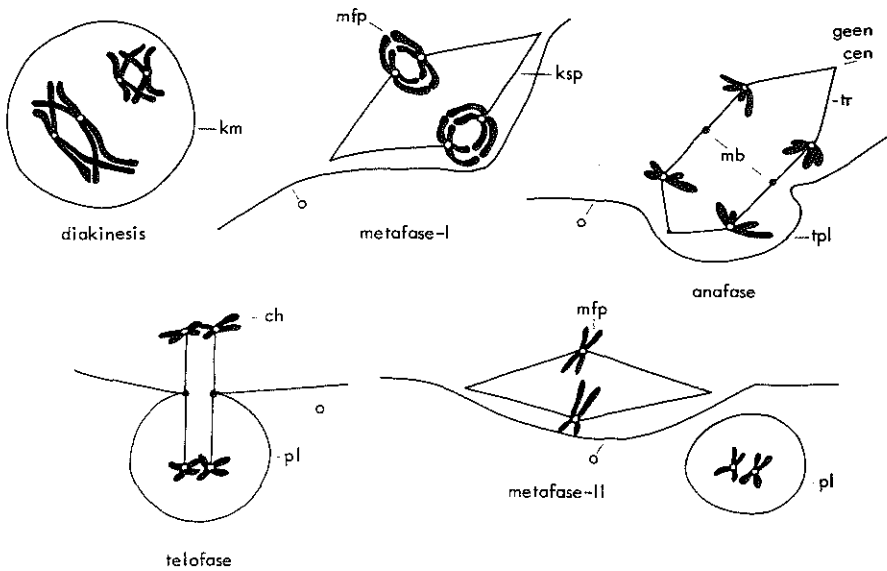
Tussen twee mitotische celdelingen bevindt de cel zich in de interfase. De cel bevat diffuus chromatine dat verspreid ligt in de kern. Gedurende de interfase is het genoom afleesbaar waardoor synthese van RNA en eiwitten mogelijk is. Bij zoogdieren zijn de meeste somatische cellen diploïd. De hoeveelheid DNA die de kern in deze fase bevat wordt aangeduid met 2c. In de S-fase van de interfase wordt de hoeveelheid DNA verdubbeld tot 4c. Vervolgens doorloopt de cel de zogenaamde G2-fase waarna celdeling plaatsvindt. Het kernmembraan verdwijnt, de chromosomen rangschikken zich in een metafaseplaat, waarna scheiding in chromatiden zichtbaar wordt. Deze chromatiden vormen de chromosomen van de dochtercellen. Na de celdeling bevat

Embryonale- postnatale periode



De rustende en de groeiende oöcyt bevinden zich in het dictyoteen stadium. Tijdens het dictyoteen stadium is de structuur van de chromosomen niet zichtbaar te maken (rat, muis, hamster).

De voltooiing van de eerste rijpsdeling vindt in het volwassen dier plaats, enige uren voor de follikelsprong.



figuur 2-2. Schema van de eerste rijpsdeling.

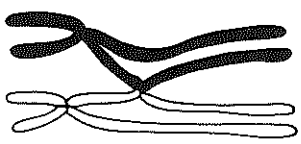
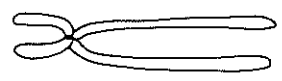
ce = centrosoom, ch = chromosoom, geen cen = geen centriool, km = kern membraan, ksp = kernspoel, mb = midbody, mfp = metafase plaat, o = oölemma, pl = poollichaampje, tpl = toekomstig poollichaampje, tr = trekdraad.

iedere dochtercel weer een hoeveelheid  $2c$  DNA. Na een aantal mitotische delingen komt het oögonium in de profase van de eerste rijpingsdeling (meiose). De verdubbeling van de hoeveelheid DNA vindt zoals bij de mitose, gedurende de S-fase plaats. De profase van de eerste rijpingsdeling verschilt met die van een gewone celdeling: a. er vindt paring van de homologe verdubbelde chromosomen plaats en b. bij de vrouwelijke kiemcel wordt de profase niet direct gevolgd door een celdeling maar duurt de profase waarin de kiemcel bepaalde interfase-eigenschappen blijft vertonen voort. Het oögonium dat met de profase van de eerste rijpingsdeling begint is per definitie een primaire oöcyt.

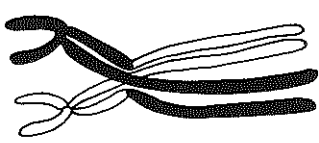
In de profase worden vijf stadia onderscheiden: leptoteen, zygoten, pachyteen, diploten en diakinese (figuur 2-2). In het leptoteen condensereren de chromosomen; in het zygoten en het pachyteen paren de homologe chromosomen. De chromosomen gaan over hun gehele lengte tegen elkaar liggen. In het pachyteen verkorten de gepaarde chromosomen zich. Tijdens deze paring is uitwisseling van genetisch materiaal tussen de homologe chromosomen mogelijk. De chromatiden van de homologe chromosomen breken op een aantal plaatsen, waarna tussen de homologe chromosomen stukken van de chromatiden verwisseld kunnen worden (Rhoades 1961). In het diploten-stadium zijn de chromosomen gescheiden. Op de breukplaatsen van de chromatiden blijven de chromosomen echter aan elkaar vastzitten (chiasmata, figuur 2-3). De eerste drie stadia worden bij de rat embryonaal en postnataal doorlopen (zie figuur 2-2); de "interfase"-oöcyt bevindt zich in het diploten-stadium. De oöcyt doorloopt het diakinese-stadium nadat een aanvang is gemaakt met de hervatting van de eerste rijpingsdeling, enige uren voor de follikelsprong.



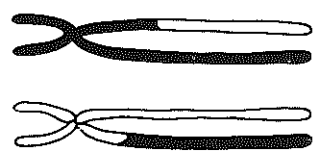
Twee gepaarde homologe chromosomen



Gepaarde chromosomen met ieder een breukplaats op één der chromatiden



Op de breukplaatsen heeft uitwisseling van een stuk chromatide plaats gevonden. De chromosomen blijven op de breukplaatsen aan elkaar vastzitten, dit resulteert in een chiasma.



Het resultaat van de eerste rijpingsdeling: twee chromosomen met ieder een nieuw stuk chromatide.

figuur 2-3. Schema van paring en crossing over van twee homologe chromosomen. (Volgens Rhoades 1961)

De chromosomen van de eicel hebben in het diploteen-stadium bij rat, muis en hamster een zeer diffuse structuur, welke met de gebruikelijke methoden van elektronenmicroscopisch onderzoek niet waargenomen kunnen worden (Franchi en Mandl 1962, Baker 1972). Bij andere soorten (o.a. de mens) blijken de chromosomen in het diploteen-stadium een "lampbrush" (tuitenrager) structuur te hebben: de chromosomen bestaan uit een kern met lussen. Aan deze lussen wordt RNA gesynthetiseerd (Davidson 1968). Aldus werd verondersteld dat ook rat, muis en hamster "lampbrush"-chromosomen moesten hebben. Dat dit waarschijnlijk het

geval is bleek uit de "squash"-preparaten van de kernen van muize-oöcyten waarin "lampbrush"-chromosomen te zien zijn (Miller en Bakken 1972). Het is gebruikelijk om de diffuse kernstructuur bij rat, muis en hamster aan te duiden met dictyoteen. Bij andere soorten blijft men van diploteen spreken (Baker 1972).

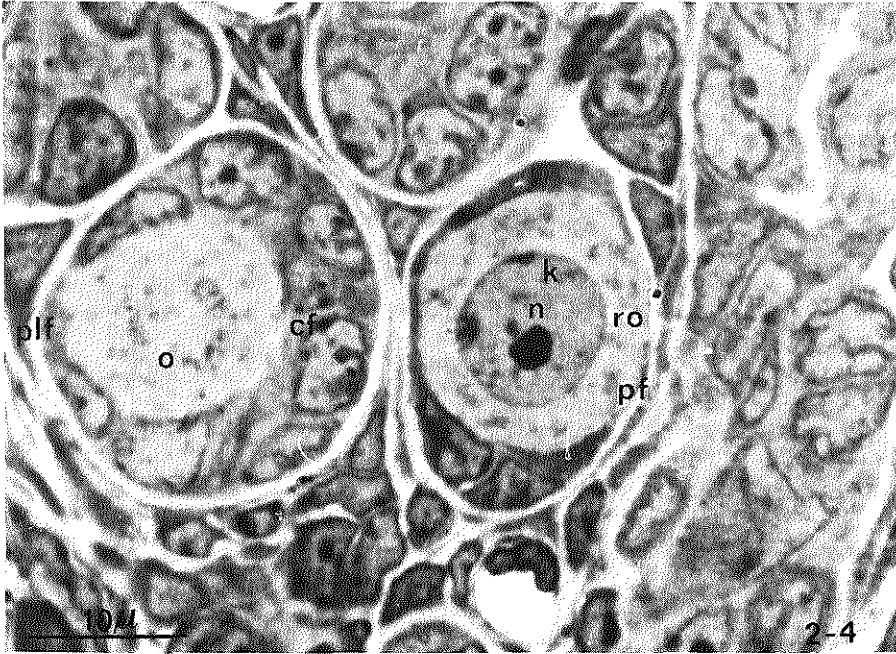
Bij de meeste zoogdieren wordt de profase van de eerste rijpingsdeling in de embryonale-postnatale periode doorlopen. Sinds de beschrijving van de verschillende stadia van de profase van de rijpingsdeling in *Ascaris* door van Beneden en Julin (1880) zijn deze stadia bij alle rijpingsdelingen zowel van plant als van dier waargenomen. De zeer karakteristieke condensatiepatronen van het chromatine tijdens de profase van de rijpingsdeling hebben in de discussie over wel of niet nieuwvorming van oöcyten in het ovariumepitheel (kiemepitheel) een belangrijke rol gespeeld. Cowperthwaite (1925) bijvoorbeeld stelde dat op grond van het feit dat bij muizen de typische profase-verschijnselen alleen in de embryonale-postnatale periode waarneembaar zijn, nieuwvorming van oöcyten na deze periode niet waarschijnlijk is. Een ander verschijnsel heeft er echter toe bijgedragen dat het toch niet eenvoudig was om hierover tot overeenstemming te komen; het overgrote deel van de kiemcellen verdwijnt door atresie tijdens het profase-stadium (figuur 2-15). Deze atresie is zo massaal dat verondersteld werd dat alle directe nakomelingen van de oerkiemcellen verdwijnen en dat nieuwvorming van oöcyten vanuit het ovariumepitheel gedurende de rest van het leven plaatsvindt. Deze veronderstelling werd versterkt door (naar later bleek onnauwkeurige) tellingen van het aantal oöcyten in het ovarium (Allen 1923, Swezy 1929, Evans en Swezy 1931). Uit deze tellingen werd geconcludeerd dat het aantal oöcyten in het ovarium afhankelijk is van de dag van de ovariële cyclus. Nauwkeurige tellingen leerden echter dat het aantal oöcyten gedurende het leven gestaag afneemt en dat van variatie in het aantal gedurende de cyclus absoluut geen sprake

is (Zuckerman 1951). De discussie over al of niet nieuwvorming van oöcyten na de embryonale-postnatale periode heeft voortgeduurd tot in de zestiger jaren.

Kiemcellen zijn alleen in de embryonale periode met getritieerd thymidine te merken. Buiten deze periode wordt geen thymidine ingebouwd. De kiemcellen die gedurende de embryonale periode gemerkt zijn blijven gedurende de rest van het leven van het dier radio-actief (Borum 1966, Peters 1969). Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden dat er bij vrouwelijke zoogdieren geen nieuwvorming van oöcyten na de embryonale periode plaatsvindt en dat de oöcyten die in de embryonale periode gevormd zijn dezelfde zijn als die in het volwassen dier worden aangetroffen.

#### 2.4. Primordiale follikels.

Na aankomst van de oerkiemcellen in de gonade-aanleg begint deze met de ontwikkeling. Het peritoneale epitheel verdikt zich en is duidelijk te onderscheiden van het eronder liggende mesenchym. De oerkiemcellen worden tussen de epitheelcellen ingebed (Brambell 1956). Zij worden oögonia genoemd zodra de primitieve gonade een ovarium wordt. Het aantal oögonia neemt door celdeling sterk toe. Deze celdelingen zijn echter niet volledig. Er blijven protoplasmaverbindingen tussen de dochtercellen bestaan. De oögonia blijven hierdoor in groepjes, einesten, bij elkaar liggen. Een einest ontstaat wellicht uit een enkele oerkiemcel (Peters 1971). De einesten vormen een band in de periferie van de gonaden. Zij worden losjes omgeven



figuur 2-4. Fragment van een ovarium van een 22 dagen oude RxU rat. Primordiale follikel (pf) met rustende oöcyt (ro). De kern van deze oöcyt bevat een nucleolus (n). Links van de primordiale follikel bevindt zich een follikel die met de ontwikkeling begonnen is. De oöcyt (o) wordt omgeven door cubische (cf) en platte follikelcellen (plf). (glutaaraldehyde en osmiumtetraoxidefixatie, eponinbedding, dikte van de coupe 0,75  $\mu$ , methyleenblauwkleuring, fasecontrastfoto met 100x objectief)

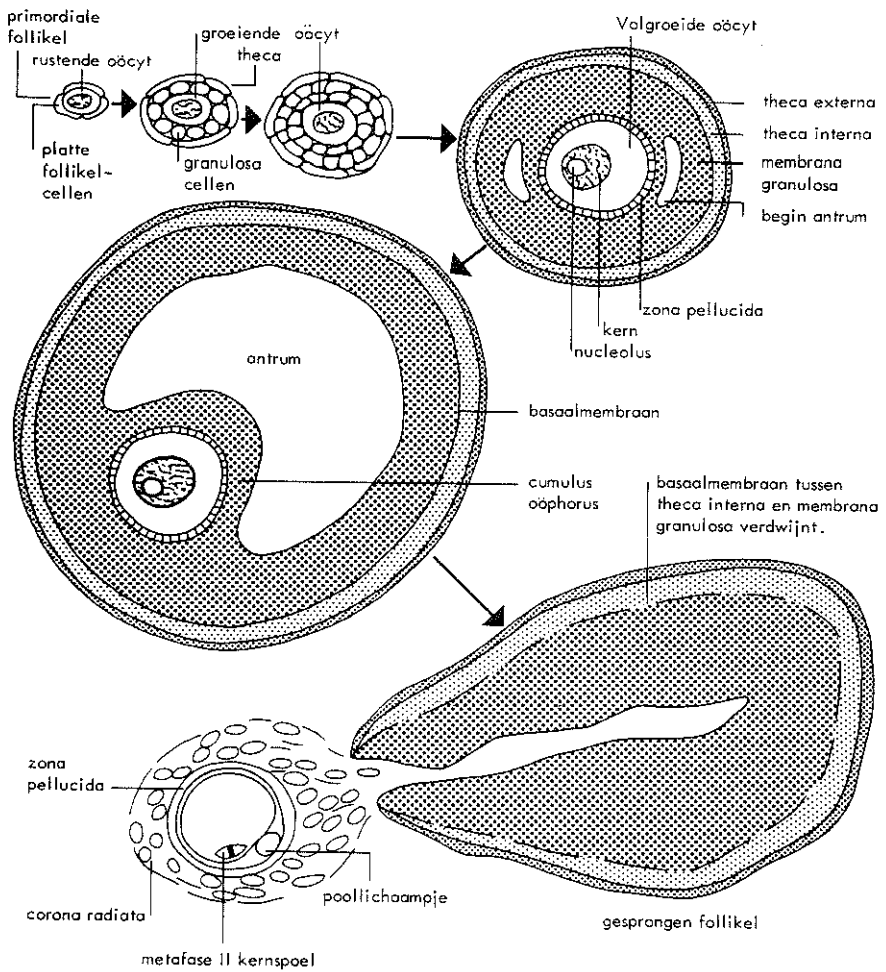


door epitheliale cellen. Dunne uitlopers van deze epitheliale cellen groeien de intercellulaire ruimten van de einesten binnen waardoor de kiemcellen en de hen omringende somatische cellen in onregelmatige strengen worden gerangschikt. De epitheliale cellen welke de oögonia omgeven worden follikelcellen genoemd. In deze fase van de ontwikkeling beginnen de oögonia met de profase van de eerste rijpingsdeling. De kiemcellen, in deze fase nu primaire oöcyten genoemd, worden omgeven door een laag platte follikelcellen. De primaire oöcyt vormt samen met de platte laag follikelcellen de primordiale follikel (figuur 2-4).

## 2.5. Follikelontwikkeling en follikelatresie.

Na hun ontstaan vormen de primordiale follikels een rustende voorraad van waaruit voortdurend een aantal met de ontwikkeling begint. Een primordiale follikel is bij de rat ongeveer 15 tot 20 $\mu$  in diameter. Een volgroeide follikel kan bij de rat een grootte van 800 $\mu$  of meer bereiken. De grootte van de volgroeide follikel is bij zoogdieren evenredig met het lichaamsgewicht van de diersoort (Brambell 1956).

Een toename in volume van de platte follikelcellen behoort tot de eerste kenmerken van follikelontwikkeling. De follikelcellen worden eerst rond, dan kubisch en vervolgens cilindrisch. De cilindrische cellen delen zich. Andere kenmerken van follikelontwikkeling zijn de toename in grootte van de oöcyt en de afzetting van zona pellucida materiaal (2.7.1) tussen oöcyt en follikelcellen. Als de follikelcellen eenmaal rond of kubisch zijn spreekt men van granulocellen. Door deling neemt het aantal granulocellen sterk toe. Een follikel met vier lagen granulocellen bevat een vrijwel volgroeide oöcyt.



figuur 2-5. Schema van follikelontwikkeling.

In de intercellulaire ruimten van follikels die een of twee cellagen granulosa-cellen bezitten verschijnen membraan-begrensde vloeistofholten, vacuolen. Deze worden lichaampjes van Call en Exner genoemd (Zamboni 1972). Bij follikels die door vier of meer lagen granulosa-cellen omgeven worden kan vervloeiing van deze vacuolen optreden. Dit is het begin van holte- of antrumvorming. De verdere groei van de follikel wordt voor een belangrijk deel veroorzaakt door toename in grootte van het antrum. Door het groter worden van het antrum verliest de oöcyt haar centrale positie en komt in een verdikking van de membraan granulosa, de zogenaamde cumulus oöphorus, te liggen. In figuur 2-5 is een schematisch overzicht gegeven van follikelontwikkeling.

Rondom de membrana granulosa worden nog twee cellagen gevormd, de theca externa en de theca interna. De theca externa bestaat aanvankelijk voornamelijk uit bindweefsel, later komen daar ook spier- en zenuwcellen bij. De theca interna bestaat voornamelijk uit afgeronde cellen, die alle kenmerken van steroïdhormoon producerende cellen hebben. Tussen theca interna en membrana granulosa ligt een basaal membraan.

De voorraad primordiale follikels wordt kleiner naarmate het individu ouder wordt (Jones en Krohn 1961a). Dit kan door degeneratie (atresie) of door follikelontwikkeling veroorzaakt worden. In de eerste weken na de geboorte degenereren bij de muis veel primordiale follikels. In het geslachtsrijpe dier is atresie van primordiale follikels echter een zeldzaam verschijnsel, de voorraad primordiale follikels wordt dan alleen door follikelontwikkeling kleiner (Pederson 1972).

Waardoor begint een primordiale follikel met follikelontwikkeling? Hypofysectomie heeft een vermindering van het aantal follikels dat met de ontwikkeling begint tot gevolg (Jones en Krohn 1961b). Uit tellingen die door

Pederson (1972) gedaan zijn is gebleken dat het aantal follikels dat met de ontwikkeling begint afhankelijk is van de dag van de ovariële cyclus of van het al dan niet zwanger zijn. Uit deze waarnemingen kan geconcludeerd worden dat voor de aanvang van de ontwikkeling van een klein aantal follikels hypofysaire hormonen niet vereist zijn. Voor de ontwikkeling van een normaal aantal, zoals tijdens de cyclus, zijn hypofysaire (gonadotrope) hormonen wel noodzakelijk.

De voorraad primordiale follikels wordt naarmate de leeftijd vordert steeds kleiner. Het blijkt dat het aantal follikels dat met de ontwikkeling begint afhankelijk is van de grootte van de voorraad primordiale follikels (Krarup et al 1971). Peters et al (1973) zijn van mening dat groeiende of atretische follikels een stof afscheiden die een remmende invloed heeft op het begin van de follikelontwikkeling. Het aantal follikels dat met de ontwikkeling begint is waarschijnlijk o.a. afhankelijk van hypofysaire hormonen. Daarnaast zijn er nog een aantal andere binnen het ovarium gelegen factoren.

Na de aanvang met de ontwikkeling tot het antrale stadium, verloopt follikelontwikkeling mogelijk onafhankelijk van gonadotrope hormonen (Peters et al 1973). Voor de vorming van een antrum en voor de verdere ontwikkeling tot sprongrijpe follikel en voor de follikelsprong zelf zijn gonadotrope hormonen wel noodzakelijk (Schwartz en McCormack 1972).

Voor inductie van de follikelsprong is een korte maar sterke gonadotrope stimulatie vereist. Een ovulatoire gonadotrope stimulus induceert behalve de follikelsprong een groot aantal veranderingen in de pre-ovulatoire follikel waaronder a. de oöcyt hervat en voltooit de eerste rijpingsdeling b. de doorbloeding van de theca interna neemt sterk toe c. bloedvaten groeien vanuit de theca interna de membrana granulosa binnen d. de afgeronde cellen van de theca interna en de granulosa cellen diffe-

rentiëren zich tot luteïncellen.

Er wordt verondersteld dat atresie van een follikelcel of atresie van de oöcyt de atresie van de gehele follikel tengevolge heeft. De follikel zou voor zijn instandhouding van zowel de oöcyt als de somatische follikelcellen afhankelijk zijn (Baker 1972). In de literatuur wordt een enkele keer melding gemaakt van follikelontwikkeling van follikels zonder oöcyt (Ohno 1967, Baker 1970). Dit zou inhouden dat voor de instandhouding van een follikel een oöcyt niet noodzakelijk is.

Benirschke en Sullivan (1966) onderzochten de ovaria van 47 muildieren. Zij konden geen enkele oöcyt ontdekken. Wel troffen zij soms een corpus luteum aan. Op grond hiervan concludeerde Ohno (1967) dat follikelontwikkeling mogelijk is zonder de aanwezigheid van een oöcyt. De chromosomen van paard en ezel zijn niet complementair (Hsu en Benirschke 1969). Het niet complementair zijn heeft tot gevolg dat de chromosomen in de profase van de eerste rijpingsdeling niet kunnen paren. De oöcyt wordt hierdoor atretisch (Ohno 1967).

Taylor en Short (1973) bestudeerden de embryologie van muilezel- en muildierovaria. Het bleek dat de meeste oöcyten inderdaad atretisch werden. Op onverklaarbare wijze bleek echter toch een enkele oöcyt door de profase te komen en aanleiding te geven tot vorming van een primordiale follikel. In een ovarium van een drieënnegentig dagen oud muildier vonden Taylor en Short een zich ontwikkelende follikel met een oöcyt. Zij concludeerden dat enkele oöcyten, die door de profase van de eerste rijpingsdeling heengekomen waren aanleiding zouden kunnen geven tot follikelontwikkeling en corpus luteum vorming. Zij achtten het onwaarschijnlijk dat follikelontwikkeling zonder oöcyt mogelijk is.

Green en Zuckerman (1951) en Mandl en Zuckerman (1952) vergeleken de toename in grootte van de oöcyt met

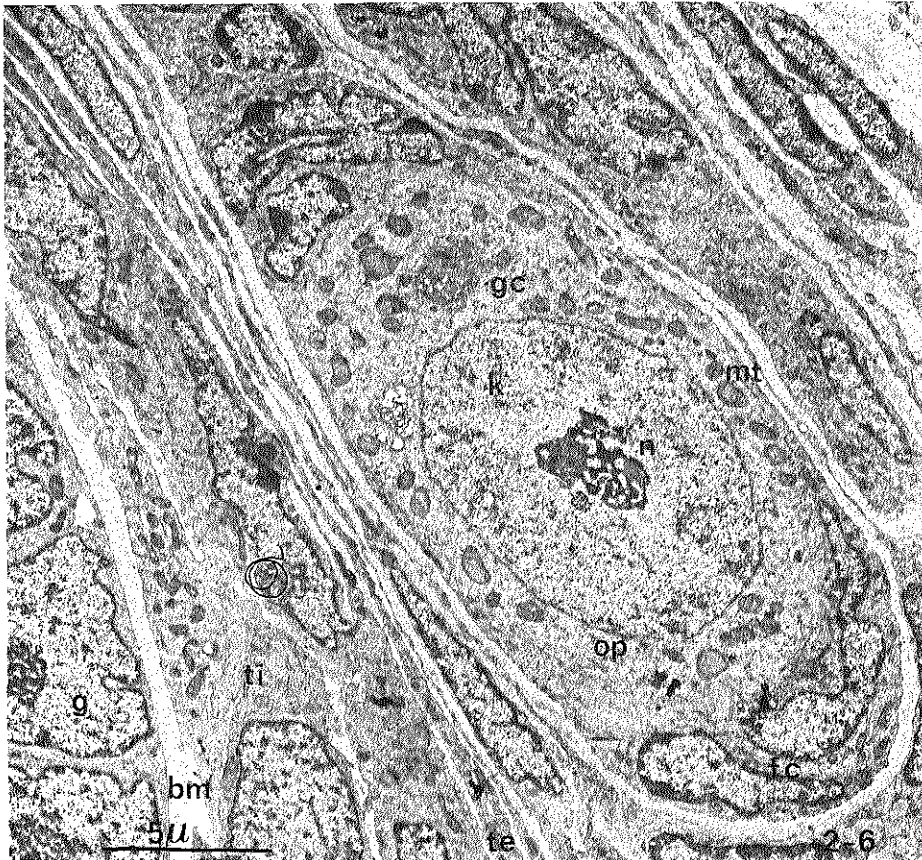
die van de follikel. Het bleek dat verhoudingsgewijs in het begin van de follikelontwikkeling de oöcyt meer in grootte toenam dan de follikel. De aanwezigheid van volgroeide oöcyten in overigens niet of nauwelijks ontwikkelde follikels van muizen die met antigonadotropineserum behandeld waren (Eshkol et al 1970) en de aanwezigheid van volgroeide oöcyten in gonadotropinevrije cultures van ovariumstukjes (Neal en Baker 1973) en de waarnemingen van Green, Mandl en Zuckerman, deed Baker (1970, 1972 a, b) concluderen dat de oöcyt de follikelontwikkeling bepaalt (zie ook Young 1961).

De eerste veranderingen die kenmerkend zijn voor het begin van follikelontwikkeling zijn met de elektronenmicroscopie waargenomen in de follikelcellen. Pas als de follikelontwikkeling duidelijk begonnen is verandert het cytoplasma van de oöcyt (Weakley 1967, Zamboni 1972). Deze elektronenmicroscopische waarnemingen geven aanleiding tot de veronderstelling dat de follikelcellen de ontwikkeling van de primordiale follikel bepalen.

De vraag of follikelontwikkeling bij de oöcyt of bij de follikelcellen begint is nog niet te beantwoorden. Ook is op de vraag waardoor een follikel met de ontwikkeling begint nog geen antwoord te geven. Voor de beantwoording van deze vragen is een zo volledig mogelijke beschrijving van het begin van follikelontwikkeling een eerste vereiste.

## 2.6. De rustende oöcyt.

In de klassieke histologie werd een niet-delende cel een rustende cel genoemd. Evenzo werd met een rustende oöcyt een niet-delende oöcyt bedoeld. Een oöcyt in een primordiale follikel, een groeiende oöcyt en een volgroeide oöcyt in een antrale follikel werden aldus rustende oöcyten genoemd (Raven 1961). Het elektronen-



figuur 2-6. Rustende oöcyt. De oöcyt bevat een kern (k) met nucleolus (n). In het oöplasma (op) zijn verspreid liggende mitochondriën (mt) en een groot Golgi-complex (gc) te zien.

Links in de foto is een gedeelte van een groeiende follikel zichtbaar met theca externa (te), theca interna (ti), basaalmembraan (bm) en granulosa cellen (g).

microscopisch beeld van de oöcyt in een primordiale follikel vertoont een weinig actieve indruk. Ook op metabool gebied is de oöcyt van een primordiale follikel weinig actief. Een groeiende oöcyt is daarentegen op metabool gebied zeer actief; het begrip rustend is niet van toepassing. Om deze reden wordt tegenwoordig met een rustende oöcyt alleen de oöcyt in een primordiale follikel aangeduid.

De rustende oöcyt synthetiseert RNA doch in aanzienlijk mindere mate dan de groeiende oöcyt. De rustende oöcyt synthetiseert ongeveer evenveel RNA als de haar omringende cellen en mogelijk juist voldoende om de toestand waarin deze oöcyt zich bevindt te onderhouden (Oakberg 1967).

De rustende oöcyt heeft een diameter van ongeveer 12 tot 15 $\mu$ . (Mandl en Zuckerman 1952, eigen waarnemingen). De kern is ongeveer 10 $\mu$  in doorsnede. De kern bevat een of twee kleine nucleoli. In lichtmicroscopische preparaten blijkt het chromatine erg korrelig (dictyoteen structuur), waardoor de nucleoli vaak niet te zien zijn. Het cytoplasma van de primordiale oöcyt is, op een concentratie van celorganellen rondom het kernmembraan na, betrekkelijk leeg. Genoemde concentratie celorganellen wordt cytocentrum (E. Anderson 1972) of Balbiani's vitelline lichaampje (Raven 1961) genoemd. Het cytocentrum is opgebouwd uit een groot en duidelijk Golgicomplex, mitochondriën, endoplasmatisch reticulum dat grotendeels glad is en veel vrije ribosomen (figuur 2-9). De mitochondriën van de migrerende oerkiecellen en de zich delende oögonia zijn langwerpige en bevatten veel cristae. De rustende oöcyt heeft ronde tot ovale mitochondriën waarin weinig cristae te zien zijn. De aanwezige cristae liggen vaak tegen de buitenwand van het mitochondrion, zodat dit meerwandig lijkt. In de cristae bevinden zich dikwijls vacuolen, een crista kan zo sterk gezwollen zijn dat het mitochon-



drien een meerwandige vacuole lijkt (Wischnitzer 1967). De mitochondriën liggen in groepjes (Odor 1960, Weakley 1966, 1967). Verder worden in het cytoplasma van de rustende oöcyt de aanwezigheid van enige corticale granula en multivesiculaire complexen beschreven (Sotelo en Porter 1959, Odor 1960, Weakley 1966, Szollosi 1972, zie paragraaf 2.7.2). Dit zijn organellen die in groeiende en pre-ovulatoire oöcyten in grote hoeveelheden voorkomen. (In figuur 2-6 is een rustende oöcyt afgebeeld.)

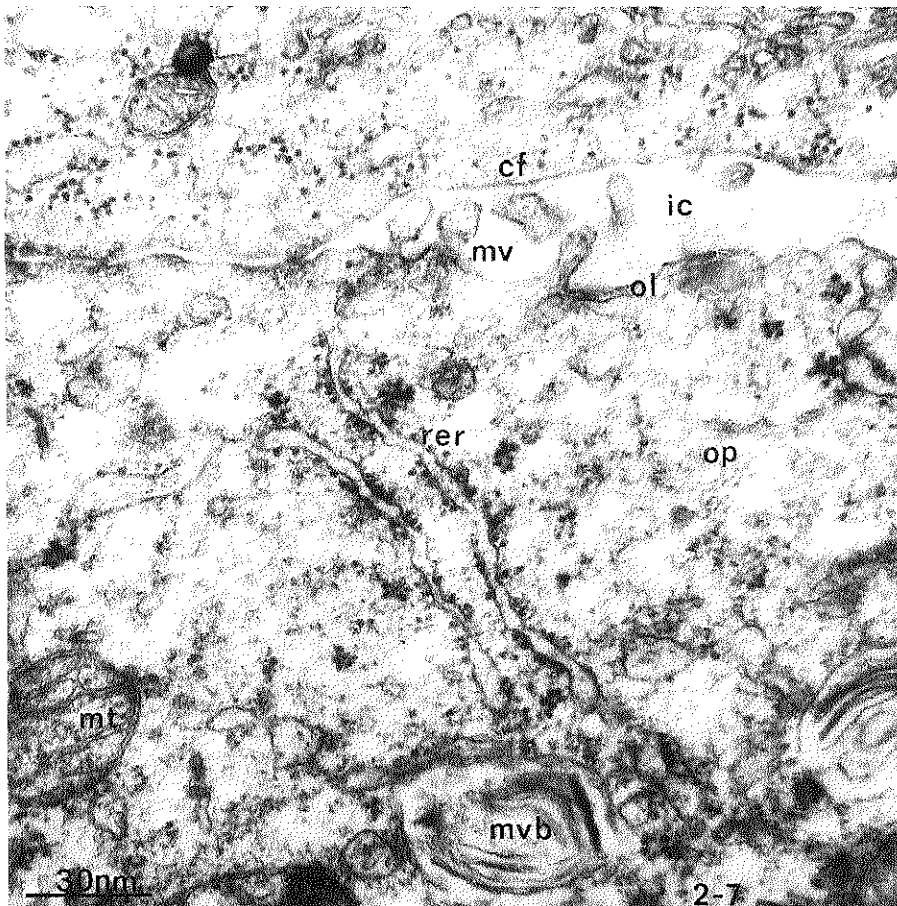
Een moeilijkheid bij het verkrijgen van inzicht in de anatomie van de rustende oöcyt is de verwarring op het gebied van de systematiek van follikels met één cellaag. Bij de bestudering van de literatuur moet steeds gelet worden op de gehanteerde terminologie. Indien de auteurs hun definities niet omschrijven, dan kunnen de door hen berichte gegevens slechts met de grootste voorzichtigheid gehanteerd worden.

## 2.7. De groeiende oöcyt.

Al vroeg in de follikelontwikkeling neemt de oöcyt in grootte toe. Deze toename wordt voortgezet totdat de diameter van de oöcyt ongeveer  $70\mu$  bedraagt (bij de rat). De oöcyt bevindt zich dan in een follikel met 4 lagen granulocellen. De follikel ondergaat het grootste deel van zijn ontwikkeling als de oöcyt volgroeid is (Mandl en Zuckerman 1952). De minimale duur van de groeifase van de oöcyt wordt bij de rat op zeven dagen geschat (Vincent en Dornfield 1948).

De groeifase van de oöcyt wordt ingeleid door het ontstaan van ruimten tussen de follikelcellen en het buitenmembraan van de oöcyt (oölemma of vitellinemembraan) (Weakley 1967). In deze intercellulaire ruimten worden brokjes secret afgezet. Deze brokjes vormen tezamen een gelatineus membraan, de zone pellucida, dat

de oöcyt omgeeft (2.7.1). Een volgroeide oöcyt heeft een zona pellucida van ongeveer  $13\mu$  dikte. Op de plaatsen waar intercellulaire ruimten gevormd zijn ontstaan op het oölemma microvilli (figuur 2-7).



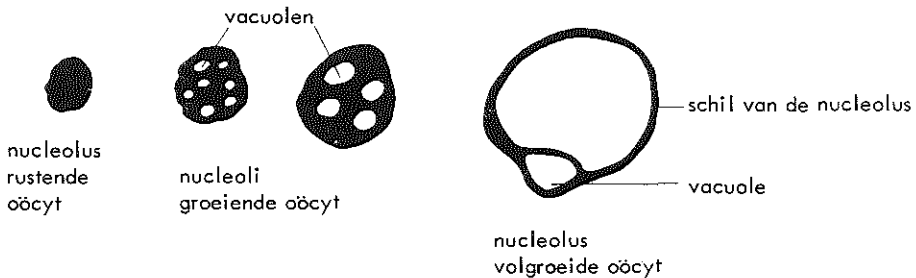
figuur 2-7. Detail van een oöcyt met follikelcel. Oölemma (ol) met microvilli (mv). De microvilli bevinden zich in een intercellulaire ruimte (ic) tussen follikelcel en oöcyt. In het oöplasma (op) zijn mitochondriën (mt), multivesicular bodies (mvb) en ruw endoplasmatisch reticulum (rer) zichtbaar. Van de follikelcel is een stukje van het cytoplasma te zien (cf).

De microvilli vergroten het buitenoppervlak van de oöcyt aanzienlijk, waardoor de mogelijkheden voor uitwisseling van voedingsstoffen en stofwisselingsprodukten vergroot worden (2.7.2 en 2.8).

Bij kleine knaagdieren (rat, muis, hamster) zijn de chromosomen gedurende het dictyoteen-stadium met klassieke elektronenmicroscopische technieken niet waarneembaar te maken. Verondersteld wordt dat de chromosomen van de groeiende oöcyt in het "lampbrush"-stadium zijn, zoals het geval is bij sommige andere diersoorten amfibieën: rhesusaap en ook de mens (Baker 1970). Mogelijk hebben de chromosomen van zoogdieroöcyten gedurende het hele diploteen- en dictyoteen-stadium de "lampbrush"-structuur. Tsuda (1965) nam bij muize-oöcyten die in het diploteen-stadium kwamen deze structuren waar.

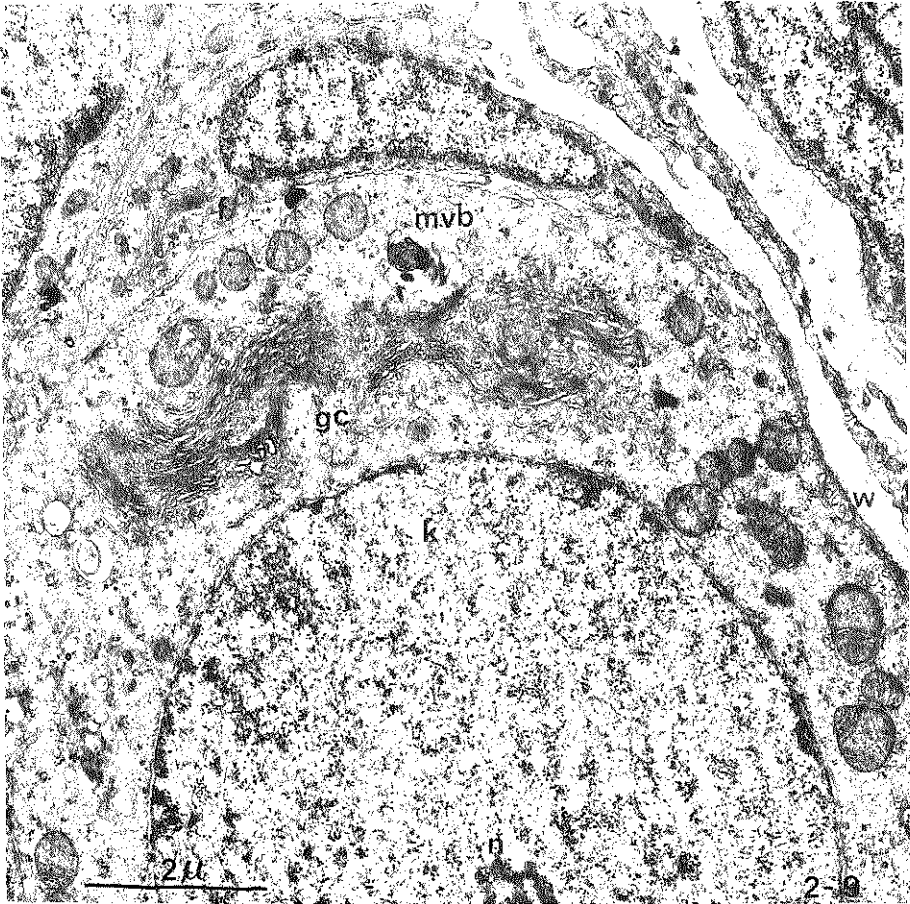
Bij amfibieën kan men aan de chromosomen van groeiende oöcyten zeer kenmerkende lus- en bolvormige lichaampjes zien. Deze lichaampjes liggen tegen de lussen van de "lampbrush"-chromosomen. Ze bestaan voornamelijk uit RNA en eiwitten en worden in het cytoplasma van de oöcyt opgeslagen. Ze spelen in de vroege embryogenese een belangrijke organiserende rol (Davidson 1968). In het cytoplasma van muis, rat en hamster vindt opslag van soortgelijk materiaal plaats in de zogenaamde nonmembraneuze cytoplasmatische lamellen (2.7.3). De synthese van dit materiaal geschiedt bij muizen wellicht op ongeveer dezelfde wijze als bij amfibieën (Chouinard 1973). In de kern van de groeiende muize-oöcyt werden door Chouinard (1973) lichaampjes (extra nuclear bodies) waargenomen, die ongeveer dezelfde structuur hadden als de RNA-partikels die aan de lussen van de "lampbrush"-chromosomen van de groeiende oöcyt van amfibieën gesynthetiseerd worden. Een probleem is dat bij de muis de associatie tussen deze lichaampjes en de "lampbrush"-chromosomen niet zichtbaar te maken is.

In de groeifase van de oöcyt wordt de nucleolus duidelijk zichtbaar. De maximale grootte van de nucleolus is ongeveer  $10\mu$  (rat). Onder de lichtmicroscopie blijkt de nucleolus eerst massief, later vormen zich kleine vacuolen. Deze vacuolen vervloeien aan het einde van de groeifase en vormen dan een grote centrale holte. De wand van de volgroeide nucleolus bevat meestal nog enkele kleine vacuolen. De ontwikkeling van de nucleolus is in figuur 2-8 weergegeven. Tijdens de groeifase van de oöcyt wordt er veel RNA in de nucleolus gesynthetiseerd. Dit RNA wordt via het nucleoplasma aan het cytoplasma afgegeven (Oakberg 1967, 1968, Baker et al 1969). In de periode waarin de nucleolus massief is en kleine vacuolen bevat, bevindt zich in de nucleolus veel RNA. De vol-groeide nucleolus zou geen RNA doch DNA bevatten (Austin 1961, Heck en Mauléon 1969).



figuur 2-8. Ontwikkeling van de nucleolus van de oöcyt van de rat.

Na aanvang van de groeifase verhuizen de cytoplasmatische organellen van hun paranucleaire positie naar de periferie van de oöcyt. Het massale Golgicomplex (figuur 2-9) fragmenteert en verspreidt zich in het cytoplasma met een concentratie in de buurt van het oölemma. Het Golgicomplex is betrokken bij de produktie van corticale granula en lysosomen. Corticale granula zijn granula die tegen en in de buurt van het oölemma liggen. Ze vormen een korrelige zone in de periferie van de oöcyt. Lysosomen



figuur 2-9. Detail van een rustende oöcyt. In het oöplasma bevindt zich het cytocentrum dat uit een groot Golgi-complex (gc) en een multivesicular body (mvb) bestaat. In de kern (k) van de oöcyt is een gedeelte van de nucleolus zichtbaar (n). De oöcyt wordt omgeven door een follikelwand die op sommige plaatsen niet veel dikker is dan twee celwanden (w).

zijn betrokken bij het afbreken van door de oöcyt opgenomen eiwitten (2.7.2). Zowel corticale granula als lysosomen zijn membraanbegrensde structuren. De corticale granula bevatten een zuur mucopolysaccharide en enkele enzymen.

Bij de bevruchting fuseren de membranen van de corticale granula met het oölemma en de inhoud van de corticale granula komt in de perivitelline ruimte, de ruimte tussen zona pellucida en het oölemma. De inhoud van de corticale granula verandert de eigenschappen van de zona pellucida, het oölemma en de perivitelline ruimte zodanig, dat een tweede zaadcel het oöplasma moeilijk kan binnendringen (2.8.3).

De groeiende oöcyt heeft alle kenmerken van een aktieve eiwitsynthetiserende cel (Baker 1970). Zowel glad als ruw endoplasmatisch reticulum en vrije ribosomen komen veelvuldig voor. Het aantal mitochondriën neemt in de groeifase sterk toe en ze behouden dezelfde structuur als in de rustende oöcyt. De mogelijke betekenis van deze structuur wordt besproken in 2.8.1. In het cytoplasma van de groeiende oöcyt van muis, rat en hamster verschijnen lamellen. Deze lamellen zijn non-membraneuze structuren, welke uit RNA en eiwitten bestaan (Burkholder et al 1971). Ze vormen mogelijk een opslag van informatie-materiaal, dat in de vroege embryogenese gebruikt wordt (2.7.3).

#### 2.7.1. Zona pellucida.

In een follikel met één laag granulocellen kunnen in de intercellulaire ruimten tussen de wanden van de oöcyt en follikelcellen brokjes van min of meer amorf materiaal worden waargenomen. Deze brokjes worden groter en talrijker naarmate de ontwikkeling van de follikel vordert. Zij vormen rondom de oöcyt een gelatineus membraan, de zogenaamde zona pellucida. Zona pellucidamateriaal

is waargenomen in follikels die verder geen tekenen van follikelontwikkeling vertonen (Chiquoine 1960, Weakley 1966). Naarmate de groei van de oöcyt vordert neemt de dikte van de zona pellucida toe (Odor en Blandau 1969a). De ontwikkeling van de zona pellucida is aan het einde van de groeifase van de oöcyt voltooid.

In de zona pellucida zijn uitlopers van follikelcellen waarneembaar. Deze uitlopers eindigen op het oölemma of op de microvilli van de oöcyt. Vanaf het begin van de groeifase van de oöcyt tot de hervatting van de rijpingsdeling bevinden zich op het oölemma microvilli. Deze vormen een borstelzone in de zona pellucida. De uitlopers van de follikelcellen en de microvilli van de oöcyt trekken zich terug gedurende de periode waarin de eerste rijpingsdeling voltooid wordt, enige uren voordat de follikelsprong plaats heeft (Odor 1960). Het directe contact tussen de celwanden van oöcyt en follikelcellen wordt dan verbroken. Het oölemma geraakt los en de oöcyt kan zich min of meer vrij binnen de omhulling van de zona pellucida bewegen.

Er is verondersteld dat de uitlopers van de follikelcellen een belangrijke rol spelen bij het transport van bouw- en voedingsstoffen van de follikelcellen naar de oöcyt. Met de elektronenmicroscopie zijn in deze uitlopers echter geen celorganellen en slechts weinig lipide druppels of granula aangetroffen (Norrevang 1968). In het cytoplasma van de oöcyt van de Rhesusaap bevinden zich aan uitlopers van follikelcellen bolvormige structuren die door het cytoplasma worden opgenomen (Hope 1965, Baker 1970, Zamboni 1974). In het algemeen is men echter van mening dat de follikelcellen op deze wijze slechts een geringe bijdrage leveren aan de voorziening van de voor de ontwikkeling van de oöcyt benodigde bouwstoffen. Welke andere functies de follikelceluitlopers zouden kunnen hebben is niet bekend. Het blijkt slechts dat hun aanwezigheid van belang is voor zowel follikelcellen als oöcyt. Ver-

breking van deze uitlopers zou tot atresie van oöcyt en follikel leiden (Baker persoonlijke mededeling).

#### 2.7.1.1. Herkomst van de zona pellucida.

Reeds in de eerste beschrijvingen van de zona pellucida komt de vraag aan de orde of de zona pellucida door de follikelcellen dan wel door de oöcyt gevormd wordt (voor een overzicht van deze discussie zie Chiquoine 1960). De zona bestaat uit twee lagen: een buitenlaag die uit zure en een binnenlaag die uit neutrale mucopolysacchariden is opgebouwd (Baker 1970). Zowel de follikelcellen als het Golgi-complex van de oöcyt worden in staat geacht mucopolysacchariden te kunnen maken (Baker 1970). De zona pellucida wordt gevormd gedurende de groeifase van de oöcyt. Tijdens deze groeifase ligt het Golgi-complex tegen het oölemma (Odor 1960). Het werd daarom mogelijk geacht, dat zowel oöcyt als follikelcellen de mucopolysacchariden maken waaruit de zona pellucida is opgebouwd (Baker 1970). Guraya (1973) daarentegen achtte dit niet waarschijnlijk. Hij kon namelijk met behulp van histochemische technieken geen spoor van zona pellucidamateriaal in het oöplasma ontdekken. In de follikelcellen trof hij echter wel materiaal aan met dezelfde structuur als de zona pellucida. Follikels die de eerste tekenen van ontwikkeling vertonen hebben zona pellucidamateriaal in de intercellulaire ruimten tussen follikelcellen en oöcyt. Het Golgi-complex van zulk een oöcyt ligt nog tegen de kern (Odor en Blandau 1969b). Het wordt niet waarschijnlijk geacht dat het reeds dan betrokken geweest kan zijn bij de vorming van dit zona pellucidamateriaal. Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden dat follikelcellen betrokken zijn bij de synthese van het materiaal waaruit de zona pellucida is

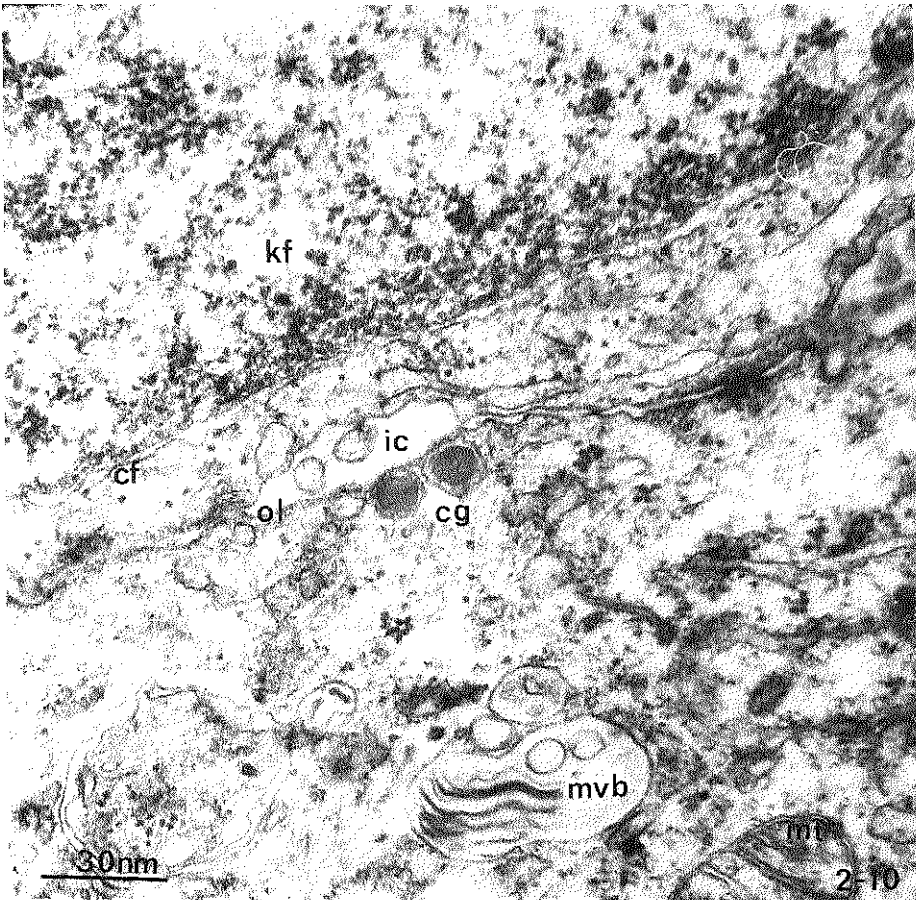


opgebouwd. Deze conclusie kan niet getrokken worden ten aanzien van de oöcyt. De zona pellucida ligt als een overall even dik membraan tegen het oölemma. Verondersteld wordt dat dit mogelijk is door een interactie tussen oöcyt en zona pellucidamateriaal. Chiquoine (1960) veronderstelde dat de oöcyt een verharder maakt die een monomeer secret afkomstig van de follikelcellen zou doen polymeriseren. Het bewijs hiervoor is echter nog niet geleverd. Het is dus niet bekend of de oöcyt in de vorming van de zona pellucida een aandeel heeft.

#### 2.7.2. Opname en synthese van voedings- en bouwstoffen tijdens de groeifase van de oöcyt.

Volgroeide oöcyten van hogere zoogdieren zijn, vergeleken met die van bijvoorbeeld vogels en reptielen, klein en dooierarm. De oöcyten van vogels en reptielen dienen voldoende reserve stoffen te bevatten teneinde de volledige ontwikkeling van het embryo mogelijk te maken. De oöcyt maakt bij deze dieren de benodigde reserve stoffen niet zelf maar haalt ze uit het bloed of krijgt ze van de haar omringende follikelcellen (Norrevang 1968). Bij de kip wordt het dooiermateriaal in de lever gemaakt, via het bloed getransporteerd en zonder enige verandering te ondergaan in de oöcyt opgeslagen (Glass 1970). De oöcyt van de hagedis *Anolis carolinensis* heeft open plasmaverbindingen met de haar omringende follikelcellen, zodat transport van allerlei stoffen rechtstreeks mogelijk is (Neaves 1970).

De volgroeide zoogdieroöcyt is weliswaar klein vergeleken met die van veel andere dieren, in vergelijking met gewone lichaamcellen is de oöcyt groot. Een epitheelcel heeft een inhoud van ongeveer  $10\mu^3$ , de volgroeide ratte-oöcyt ongeveer  $3.10^5\mu^3$ . De volgroeide ratte-oöcyt heeft ongeveer een 1000x groter volume dan de rustende



figuur 2-10. Detail van een oöcyt met follikelcel. Het oöplasma van de oöcyt bevat o.a. een multivesicular body (mvb), een mitochondrion (mt) en corticale granula (cg) die tegen het oölemma (ol) liggen. Tussen follikelcel en oöcyt bevindt zich een intercellulaire ruimte (ic). Van de follikelcel is een gedeelte van de kern (kf) en een gedeelte van het cytoplasma (cf) zichtbaar.

oöcyt.

Glass (1970) injiciëerde muizen met eiwitten die gemerkt waren met een fluorescerende stof. Ongeveer een uur na de injectie was een dergelijk eiwit in het cytoplasma van de oöcyt aantoonbaar. Na ongeveer acht uur was het eiwit niet meer aantoonbaar. De oöcyt had het eiwit blijkbaar opgenomen en binnen 8 uur afgebroken. E. Anderson (1972) injiciëerde een konijn intraveneus met mierikswortelperoxidase, een eiwit dat met een histochemische methode makkelijk aantoonbaar is. Vijftien minuten na de injectie was het mierikswortelperoxidase aantoonbaar in de zona pellucida en in de perivitelline-ruimte. Dertig minuten na de injectie was het aantoonbaar in invaginaties van het oölemma. Na een uur bevond het enzym zich binnen membraanbegrensde blaasjes, afgesnoerde invaginaties van het oölemma. Deze methode van opname wordt micropinocytose genoemd. De micropinocytoseblaasjes fuseren met lysosomen en tezamen vormen zij de zogenaamde "multivesicular bodies" (figuur 2-10). In deze lichaampjes worden de micropinocytoseblaasjes afgebroken door enzymen, die zich in de lysosomen bevinden. De "multivesicular bodies" vormen een onverteerbaar restant, de zogenaamde "residual bodies". Deze komen ook voor in het cytoplasma van somatische cellen. De aanwezigheid van een groot aantal "residual bodies" is een teken van celveroudering en is mogelijk een oorzaak van celdood. De "residual body" is een karakteristieke verschijning in de menselijke oöcyt (E. Anderson 1972). Tot voor kort werden de "residual bodies" niet als zodanig in het cytoplasma van de oöcyt herkend. Een veel gebruikte benaming voor "residual bodies" was "dense body" (Odor 1960, Hope 1965) (zie ook 2.10).

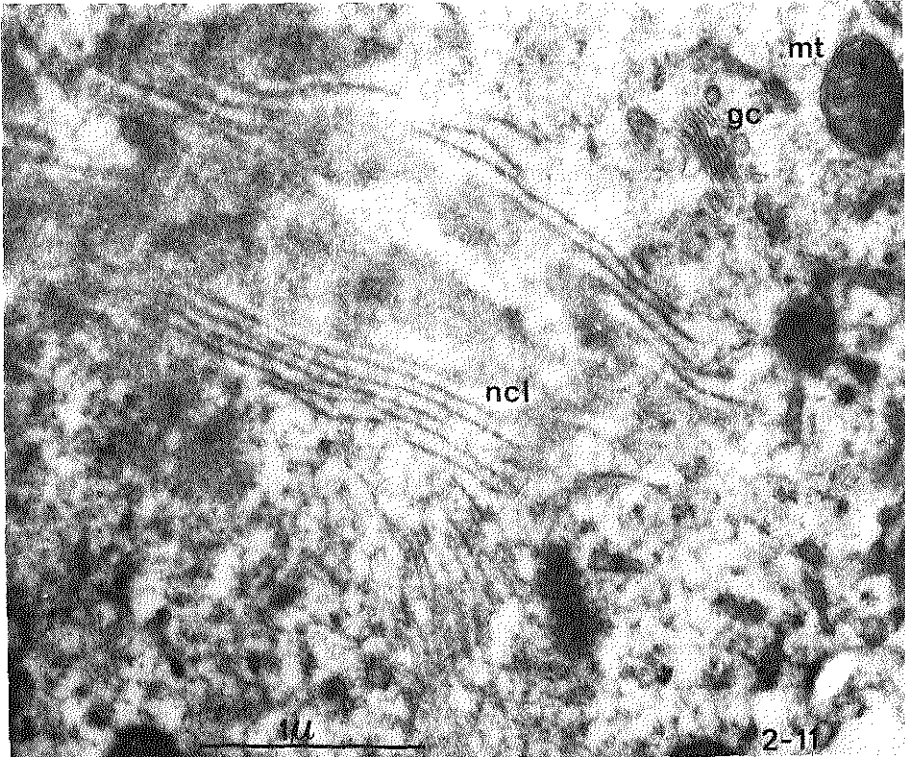
W.A. Anderson (1972) heeft soortgelijke experimenten als E. Anderson gedaan bij de rat. Ook W.A. Anderson vond mierikswortelperoxidase binnen enkele minuten terug in de perivitelline ruimte. Micropinocytose van mierikswortel-

peroxidase werd door hem niet waargenomen. Hieruit concludeerde hij dat de selectie van de stoffen die een oöcyt opneemt plaatsvindt op het niveau van het oölemma en dat deze selectie soortspecifiek is.

De oöcyt heeft een systeem om eiwitten op te nemen en deze af te breken. Ook heeft de oöcyt alle kenmerken van een actieve eiwitsynthetiserende cel (Baker 1970, Zamboni 1972). Er zijn veel ribosomen en er is veel glad en ruw endoplasmatisch reticulum. De oöcyt maakt in de groeifase veel RNA. Radioactief uridine wordt snel in de kern geïncorporeerd en vervolgens aan het cytoplasma afgegeven (Oakberg 1967, 1968, Baker et al 1969). Het oölemma heeft een groot buitenoppervlak en het is bereikbaar voor alle essentiële voedingsstoffen. Waarschijnlijk heeft bij zoogdieren de oöcyt zelf een actieve rol bij de synthese van bouw- en reservestoffen en is de oöcyt hiervoor niet afhankelijk van andere zich elders in het lichaam bevindende cellen (Hastings II et al 1972).

### 2.7.3. Non-membraneuze cytoplasmatische lamellen.

In het cytoplasma van de oöcyt van de muis, rat en hamster komen fibrillaire elementen voor. Deze elementen ontstaan als de oöcyt reeds enige tijd in de groeifase is: bij de hamster als de oöcyt omgeven is met één laag kubische granulosa cellen, bij de rat als de oöcyt omgeven is door twee lagen granulosa cellen en bij de muis als de oöcyt omgeven is door drie lagen (Weakley 1968). Zij zijn beschreven door o.a. Mazanek (1965), Szollosi (1965, 1972), Weakley (1966, 1968) en Burkholder et al (1971). De lamellen liggen in groepjes van 2 tot 10 of meer bij elkaar, ze vertakken zich en voegen zich weer samen. In een snijvlak vertonen zij bij de rat en bij de muis een lengte van 1 tot 2 $\mu$ , een dikte van ongeveer



figuur 2-11. Detail van het cytoplasma van een groeiende oöcyt.

gc= Golgi-complex,

mt= mitochondrion,

ncl= non-membraneuze cytoplasmatische lamellen.

15nm en een gemiddelde hoogte van 150 nm. De onderlinge afstand is bij de rat ongeveer 100-130 nm; de dikte van het filament neemt door aggregatie van amorf materiaal toe tot ongeveer 24 nm (figuur 2-11). Bij de hamster krijgen de lamellen een dubbele structuur, die een dikte heeft van ongeveer 40 nm. In de ruimte tussen de filamenten worden vaak ribosomen aangetroffen. De lamellen zelf hebben een granulaire, kralenkettingachtige structuur. De wijze waarop de lamellen gemaakt worden is niet bekend. Ze zijn niet geassocieerd met andere cytoplasmatische elementen.

Over de functie van de lamellen zijn verschillende suggesties gedaan. Szollosi (1972) noemde ze dooierplaten. Hij veronderstelde dat ze voor de oöcyt een voedselvoorraad vormden tijdens de eerste delingen na de bevruchting. Na de bevruchting verdwijnen ze namelijk geleidelijk. Getritieerd uridine wordt in de groeiende oöcyt snel geïncorporeerd. Hieruit blijkt dat de RNA-synthese groot is (Oakberg 1967, 1968, Baker et al 1969). Het cytoplasma van de volgroeide oöcyt fluoresceert na kleuring met acridine-oranje nauwelijks en ook de absorptie van UV-licht van 260 nm is gering (Austin en Braden 1953, Austin en Bishop 1959, Austin 1961). Aldus werd verondersteld dat het RNA, dat tijdens de groeifase gesynthetiseerd wordt direct voor de eiwitsynthese verbruikt wordt en dat de volgroeide oöcyt weinig of geen RNA bevat. Dit zou de zoogdieroöcyt in een bijzondere positie plaatsen omdat bij alle lagere vertebraten, die tot zover onderzocht, de volgroeide oöcyt een zeer grote voorraad RNA bevat.

Burkholder et al (1971) maakten "squash"-preparaten van muize-oöcyten en incubeerden deze preparaten met DNA-se, RNA-se of trypsine. Aan de hand van het elektronenmicroscopisch beeld van het verdwijningspatroon stelden ze vast dat de non-membraneuze lamellen opgebouwd zijn uit RNA-granula, die in een netwerk van eiwit verpakt zijn.

Burkholder et al (1971) zijn van mening dat de geringe UV-absorptie en de geringe fluorescentie na kleuring met acridine-oranje van het oöplasma mogelijk veroorzaakt wordt door maskering van het RNA door de eiwitmantel. De conclusie van Austin, Braden en Bishop (Austin en Braden 1953, Austin en Bishop 1959, Austin 1961) waarin gesteld wordt dat de zoogdieroöcyt geen of weinig RNA bevat is blijkbaar onjuist. De volgroeide zoogdieroöcyt bevat evenals de volgroeide oöcyt van lagere vertebraten een grote hoeveelheid RNA. Van een uitzonderingspositie is geen sprake.

In de amfibieënoöcyt wordt gedurende de groeifase zeer veel ribosomaal RNA gevormd, dat in een inaktieve vorm in het cytoplasma wordt opgeslagen. Als na ovulatie en bevruchting de kern chirurgisch verwijderd wordt is de vorming van een soort blastula toch mogelijk. Het cytoplasmatische RNA bevat hiervoor de informatie (Davidson 1968). Mogelijk is dit bij zoogdieren ook het geval (Bloom en Mukherjee 1972). Tijdens de groeifase wordt er RNA in het cytoplasma opgeslagen dat na de bevruchting geleidelijk verdwijnt.

De wijze van RNA-opslag is waarschijnlijk soortspecifiek. Zamboni en Mastroianni (1966) namen rosette-achtige ophopingen van ribosomen in het oöplasma van het konijn waar, welke mogelijk analoog zijn met de hier beschreven lamellen.

## 2.8. De volgroeide oöcyt.

De groeifase van de oöcyt is beëindigd als de oöcyt zich bevindt in een follikel met vier lagen granulocellen (Mandl en Zuckerman 1952). De follikel zelf stopt niet met groeien doch blijft in grootte toenemen. In deze periode van follikelontwikkeling verkeert de oöcyt in betrekkelijke rust. Er vindt geen of weinig RNA- en eiwitsynthese plaats. Een volgroeide oöcyt die uit haar follikel geïso-

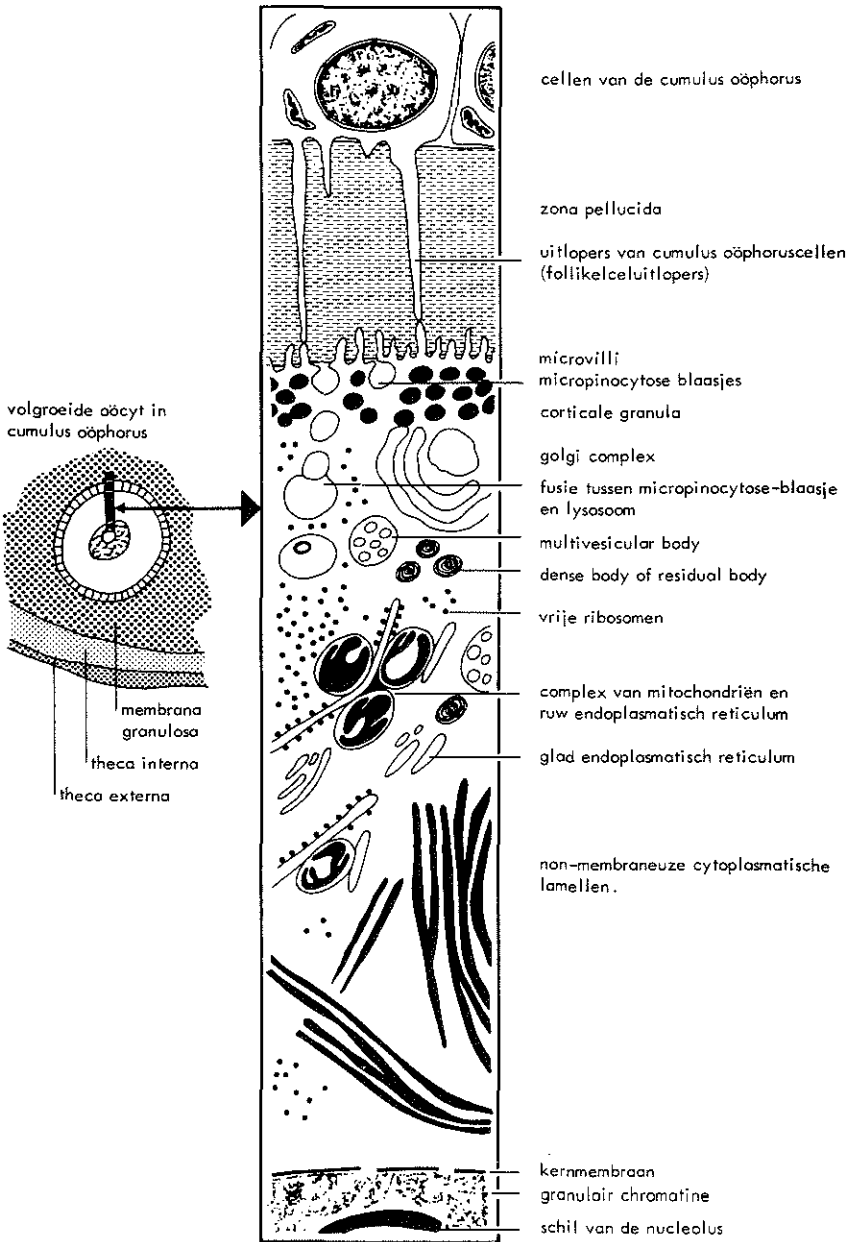
leerd en overgebracht wordt in een incubatiemedium kan de eerste rijpingsdeling hervatten (Pincus en Enzmann 1935, Biggers 1972, Zeilmaker et al 1972). Het lijkt of aan het einde van de groeifase van de oöcyt al het informatie-materiaal dat de oöcytrijping en eerste stadia van embryonale ontwikkeling mogelijk maakt in het cytoplasma van de oöcyt ligt opgeslagen. Déblokkering van dit informatiemateriaal vindt na de bevruchting plaats (Davidson 1968).

In de pre-ovulatoire follikel induceert een ovulatoire gonadotrope stimulus de voltooiing van de eerste rijpingsdeling. Het eerste poollichaampje wordt afgesnoerd en de oöcyt komt in de metafase van de tweede rijpingsdeling (2.8.2). Na het voltooiën van de eerste rijpingsdeling vindt de follikelsprong plaats en de oöcyt komt in de eileider. Binnendringen van een zaadcel induceert de voltooiing van de tweede rijpingsdeling en de aanvang van de embryonale ontwikkeling (2.8.3).

2.8.1. De oöcyt in de periode tussen het einde van de groeifase en de hervatting van de eerste rijpingsdeling.

Er wordt geen of slechts weinig getritieerd uridine door de volgroeide oöcyt ingebouwd; er vindt blijkbaar weinig of geen RNA-synthese plaats (Oakberg 1967, Baker et al 1969). Zij bevindt zich in een periode van geringe metabole activiteit (Oakberg 1967). De mitochondriën liggen uniform verspreid door het cytoplasma. De associatie tussen ruw endoplasmatisch reticulum en mitochondriën blijft echter gehandhaafd (Szollosi 1969). De mitochondriën hebben vrijwel dezelfde structuur als in de primordiale oöcyt. De cristae zijn gezwollen en liggen merendeels tegen de buitenwand van het mitochondrion





figuur 2-12. Schematisch overzicht van het cytoplasma van een volgroeide oöcyt.

(Szollosi 1969, Weakley 1966, Wischnitzer 1967). In het cytoplasma van de muize-oöcyt worden in deze periode weinig corticale granula gevormd. Bij andere soorten vormen de corticale granula een zone tegen het oölemma. Het cytoplasma van de volgroeide oöcyt lijkt niet verschillend van dat van de groeiende oöcyt, uitgezonderd de ligging van de mitochondriën (Zamboni 1972) (zie figuur 2-12 voor een schematisch overzicht van het cytoplasma van een volgroeide oöcyt).

#### 2.8.2. De voltooiing van de eerste rijpingsdeling.

De membrana granulosa van de pre-ovulatoire follikel bevat een verdikking, de cumulus oöphorus, waarin de oöcyt ligt. Een ovulatoire gonadotrope stimulatie heeft tot gevolg dat de cumulus oöphorus losgeraakt van de membrana granulosa. De oöcyt met de haar omringende follikelcellen komt hierdoor vrij in de antrale holte te liggen. De intercellulaire ruimten van de cellen die de oöcyt omgeven worden met een visceuze vloeistof opgevuld en zo wordt er om de oöcyt een corona radiata gevormd. De ovulatoire gonadotrope stimulus heeft eveneens tot gevolg dat de follikelceluitlopers uit de zona pellucida worden teruggetrokken, waardoor het contact tussen follikelcellen en oölemma verloren gaat (Odor 1960). Evenzo trekken de microvilli van het oölemma zich uit de zona pellucida terug. De oöcyt komt hierdoor vrij binnen de zona pellucida te liggen. Tussen oölemma en zona pellucida wordt een duidelijk zichtbare perivitelline ruimte gevormd (Van Beneden 1875). Uit de met de elektronenmicroscopie gedane waarnemingen blijkt dat de ribosomen van het ruw endoplasmatisch reticulum verdwijnen. Er blijft alleen glad endoplasmatisch reticulum over (Szollosi 1969). De mitochondriën houden dezelfde structuur. In het cytoplasma van de muize-oöcyt worden corticale

granula gevormd (Merchant en Chang 1971). Bij andere soorten worden de corticale granula gedurende de groei-fase van de oöcyt gevormd.

In de kern van de oöcyt worden de chromosomen zichtbaar. Kernmembraan en nucleolus verdwijnen. Er wordt een kernspoel gevormd, die parallel met het oölemma komt te liggen. Centriolen, die bij de mitotische deling aanwezig zijn, ontbreken (Szollosi et al 1973). In het midden van de kernspoel worden de chromosomen in een metafaseplaat gerangschikt. Daarna vindt scheiding van de homologe chromosomen plaats en aan ieder uiteinde van de kernspoel komt een chromatine-groep. Tijdens het uiteengaan van de homologe chromosomen wentelt de kernspoel  $90^{\circ}$ . De spoel staat dan loodrecht op het oölemma. Eén uiteinde van de kernspoel ligt aldus in een uitstulping van het oölemma, het toekomstige poollichaampje. Het andere uiteinde blijft in het oöplasma. Rondom het midden van de kernspoel wordt het eerste poollichaampje afgesnoerd. De eerste rijpingsdeling is dan voltooid. In het in de oöcyt achtergebleven chromatine worden chromosomen zichtbaar, die in een metafaseplaat van een nieuwe kernspoel gerangschikt worden. Het verloop van de eerste rijpingsdeling is schematisch weergegeven in figuur 2-2.

De morfologie van de rijpingsdeling van de oöcyt komt bij de bespreking van het experimentele werk aan de orde (hoofdstuk 4).

### 2.8.3. Bevruchting en tweede rijpingsdeling.

De follikelsprong vindt bij de meeste zoogdieren plaats als de oöcyt zich in de metafase van de tweede rijpingsdeling bevindt. Binnendringen van een zaadcel heeft tot gevolg dat de tweede rijpingsdeling hervat wordt. In de chromosomen die in de metafaseplaat gerangschikt zijn (metafase II) worden de chromatiden zichtbaar.

Per chromosoom blijft één chromatide in het oöplasma en gaat één chromatide naar het poollichaampje, dat aan het einde van de tweede rijpingsdeling wordt afgesnoerd. Na afsnoering van het tweede poollichaampje wordt er in de eicel een kern, een zogenaamde pronucleus, gevormd. Het is mogelijk door afkoeling of door overbrenging van de ratte-oöcyt uit de tubae in een kweekmedium, het afsnoeren van het tweede poollichaampje te induceren (Thibault 1949, Austin en Braden 1954, Zeilmaker en Verhamme 1974). Voor de opheffing van de blokkade op de anafase is een niet specifieke stimulus blijkbaar voldoende. Bij amfibieën kan de tweede rijpingsdeling geïnduceerd worden door aanprikken van de oöcyt. Dit kan leiden tot de ontwikkeling van een haploïd individu (Beatty 1967). Bij zoogdieren is een haploïde embryonale ontwikkeling slechts tot het blastulastadium waargenomen (Tarkowski et al 1970, Beatty 1972).

De vrijgekomen oöcyt is omgeven door een corona radiata. De cellen van de corona radiata zijn ingebed in een taai vloeistof. Om te kunnen bevruchten moet een zaadcel eerst door de corona heen alvorens zich aan de zona pellucida te kunnen hechten. Zaadcellen hechten zich in de regel niet aan een soortvreemde zona pellucida. Zaadcellen en zona pellucida hebben waarschijnlijk soortspecifieke receptoren (Hartmann en Hutchison 1974). De zaadcel gaat door de zona pellucida heen en fuseert met het oölemma. Vervolgens komt de kern van de zaadcel in het oöplasma (Austin 1972). Het contact tussen zaadcel en oölemma induceert het fuseren van de membranen van de corticale granula met het oölemma. De inhoud van de corticale granula komt in de perivitelline ruimte (Szollosi 1967). Dit wordt de corticale reactie genoemd. De kern van de zaadcel die in het oöplasma is gekomen, zwelt en vormt een pronucleus. Bij zoogdieren gaan de pronucleï tegen elkaar liggen doch er blijft een scheiding bestaan. Pas als de membranen van de pronucleï verdwijnen gedurende

de profase van de eerste klieving komen de chromosomen van zaad- en eicel bij elkaar. De eigenlijke bevruchting is dan een feit (Longo 1973).

Een oöcyt wordt in de regel door slechts één zaadcel bevrucht. Blijkbaar is er een mechanisme om meervoudige bevruchting te voorkomen. Een konijne-oöcyt bevat enkele uren na bevruchting een vrouwelijke en een mannelijke pronucleus. De perivitelline ruimte bevat echter vele zaadcellen. Het oölemma voorkomt blijkbaar dat er meer dan één zaadcel het oöplasma binnendringt.

Soms wordt in de perivitelline ruimte van de oöcyt van rat of muis een enkele zaadcel aangetroffen als de bevruchting al heeft plaatsgevonden. Als er zaadcellen in de perivitelline ruimte zijn dan is hun aantal veel kleiner dan bij het konijn. Er is waarschijnlijk een korte tijd na de bevruchting waarin de zona pellucida nog geen effectieve barrière vormt. In deze periode kunnen enkele zaadcellen door de zona heendringen. Ze komen echter niet verder dan de perivitelline ruimte want het oölemma vormt tenslotte een ondoordringbare barrière.

Bij hamster, schaap en hond komen zeer zelden zaadcellen in de perivitelline ruimte voor. De zona pellucida vormt na de bevruchting bij deze diersoorten een zeer effectieve barrière voor andere zaadcellen.

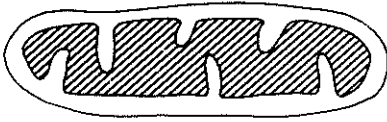
Er zijn blijkbaar twee mechanismen om meervoudige bevruchting te voorkomen: zowel oölemma als zona pellucida of beide kunnen ondoordringbaar voor zaadcellen worden. Het ondoordringbaar worden van de zona pellucida wordt zona-reactie genoemd (Braden et al 1954, Young 1961).

Voordat bevruchting heeft plaatsgevonden is een hechte binding tussen zaadcellen en zona pellucida mogelijk. Na de bevruchting is deze binding minder hecht. Verondersteld wordt dat de zona pellucida specifieke receptoren voor zaadcellen heeft, die na de bevruchting verdwijnen (Hartmann en Gwatkin 1971). Incubatie van niet-bevruchte oöcyten

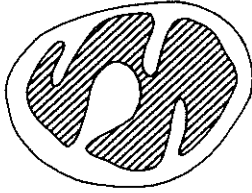
met de geïsoleerde inhoud van corticale granula van andere oöcyten heeft tot gevolg dat de hechting tussen zona pellucida en zaadcellen wordt zoals deze bestaat bij bevruchte oöcyten. Hieruit wordt geconcludeerd dat de inhoud van de corticale granula de zona reactie induceert (Barros en Yanagimachi 1971). De corticale granula bevatten een trypsine-achtige protease, dat hiervoor verantwoordelijk wordt geacht (Gwatkin et al 1973).

#### 2.8.4. Mitochondriën.

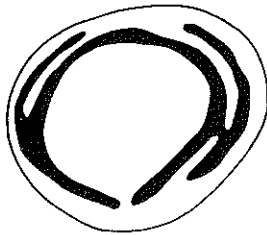
Oerkiecellen en oögonia bevatten langwerpige mitochondriën met platte cristae die loodrecht op de lengte-as staan. Dit zelfde type mitochondrion komt ook in de follikelcellen voor. Bij de differentiatie van oögonium naar oöcyt verandert de morfologie van de mitochondriën. Zij worden afgerond van vorm en bevatten veel minder cristae. De cristae liggen vaak tegen de wand van het mitochondrion of bevatten vacuolen. Bij de muis is één van de cristae zodanig gezwollen dat het mitochondrion een meerwandige vacuole lijkt (Wischnitzer 1967). Per soort zijn er variaties in de vorm van de mitochondriën van de oöcyt. De basisstructuur is echter bij alle soorten gelijk (Szollosi 1972). Gedurende de periode die ligt tussen de differentiatie tot rustende oöcyt en het morulastadium blijft de structuur van de mitochondriën onveranderd. Tijdens de overgang naar het blastulastadium verandert de structuur van de mitochondriën. Ze worden langwerpig van vorm en de cristae, waar de vacuolen uit verdwijnen, komen weer loodrecht op de lengte-as te staan (Anderson et al 1970). In figuur 2-13 zijn de veranderingen die in het mitochondrion van de kiemcel plaatsvinden schematisch weergegeven.



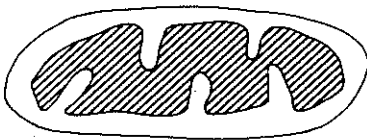
mitochondrion van een oögonium



mitochondrion van een pas gevormde  
primaire oöcyt



mitochondrion van een rustende,  
groeiende en een volgroeide oöcyt.  
Deze vorm verandert gedurende de  
overgang van morula- naar  
blastulastadium



vorm van mitochondrion vanaf  
blastulastadium

figuur 2-13. Vorm van mitochondrion van oögonium, oöcyt en blastocyst.

De fysiologische betekenis van de veranderingen die in de mitochondriën plaatsvinden is mogelijk af te leiden uit de experimenten van Fridhandler et al (1957). Zij maten de zuurstofconsumptie van ova in verschillende stadia van de embryonale ontwikkeling. Van het tweecellig stadium was dit 0,41 tot 0,48 ml/embryo/uur. In het blastula-stadium was dit 1,70 ml/embryo/uur. Tijdens de overgang van morula naar blastula neemt de zuurstofconsumptie dus tot het viervoudige toe. Deze toename loopt parallel met de vormverandering in de mitochondriën (A. Anderson et al 1970). Een dergelijk patroon van zuurstofconsumptie en vormverandering van de mitochondriën vindt ook in het rattehart plaats. Veertien dagen na de bevruchting verdwijnen de vacuolen uit de mitochondriën en parallel daarmee stijgt de zuurstofconsumptie (Szollosi 1972). Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden dat de zuurstofconsumptie van de oöcyt in de periode die ligt tussen de differentiatie tot primaire oöcyt en het blastula-stadium, laag is. Mogelijk geschiedt de energievoorziening van de oöcyt in deze periode voornamelijk door anaerobe glycolyse (Gwatkin en Haidri 1974).

## 2.9. Oögenese en spermatogenese.

De eerste fasen van de gonade-ontwikkeling zijn bij beide geslachten gelijk. Oerkiemcellen migreren naar de gonade-aanleg. Gedurende de migratieperiode en de eerste dagen na aankomst in de gonade-aanleg delen de oerkiemcellen zich. Zodra onderscheid tussen een toekomstige testikel en een toekomstig ovarium mogelijk is worden de kiemcellen respectievelijk prespermatogonia en oögonia genoemd. De delingen van de kiemcellen stoppen bij beide geslachten in dezelfde periode. Bij de rat is dit tussen de 16e en de 18e dag *post conceptum*. De prespermatogonia komen in een rustfase. In de oögonia zijn de eerste stadia van de profase van de eerste rijpings-

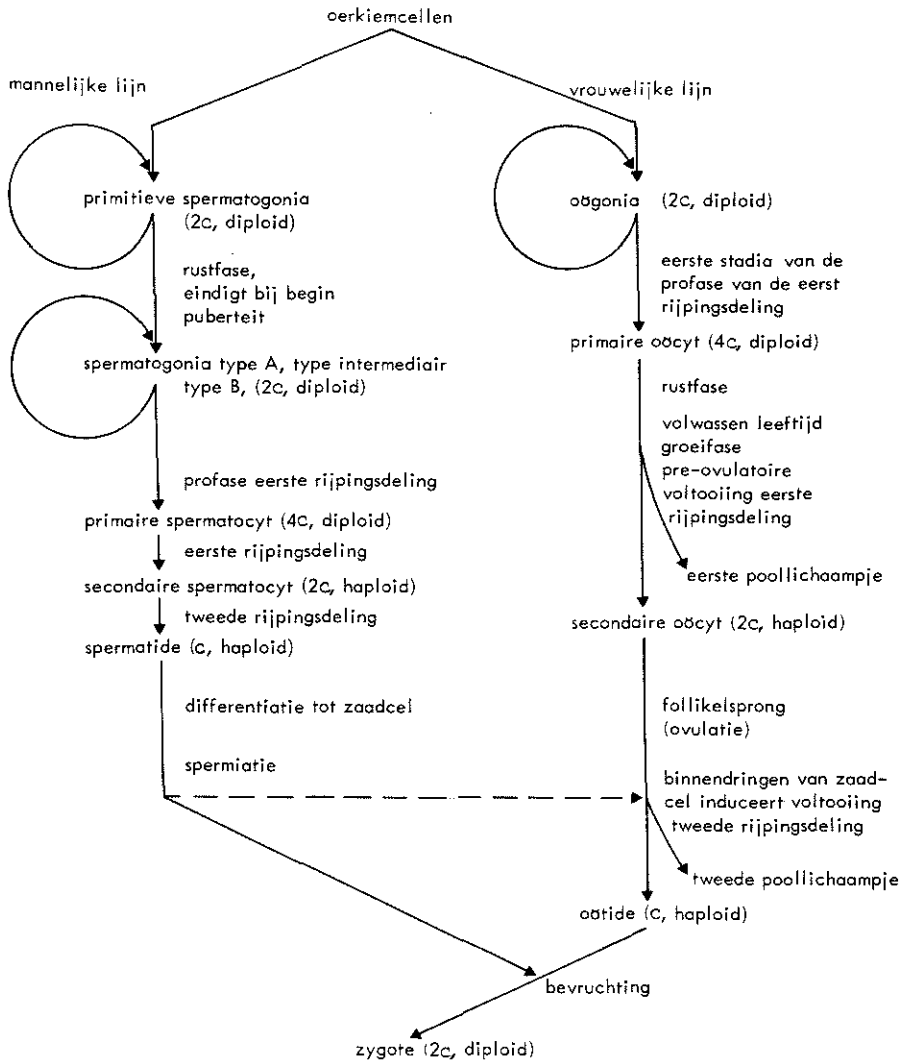


deling zichtbaar. Na het doorlopen van de eerste stadia van de profase van de eerste rijpingsdeling komen de vrouwelijke kiemcellen in een rustfase. De rustfase van de prespermatocyten eindigt bij de aanvang van de puberteit. Er vindt dan differentiatie tot spermatogonia van het type A plaats. De spermatogonia A delen zich en vormen nieuwe spermatogonia A en spermatogonia waaruit door verdere mitotische delingen primaire spermatocyten gevormd worden. De rustfase van de primaire oöcyt eindigt als de oöcyt in de groeifase komt. De primaire oöcyt kan vanaf de embryonale periode tot de dood van het dier in de rustfase blijven.

Bij de oögenese noemt men een oögonium een primaire oöcyt als de profase van de eerste rijpingsdeling aanvangt. Evenzo noemt men een spermatogonium een primaire spermatocyt als de profase van de eerste rijpingsdeling begint. In de profase van de eerste rijpingsdeling zijn dezelfde stadia te onderscheiden als bij de oöcyt. Bij de spermatocyt is er echter geen rustfase in de profase; de deling wordt zonder pauze voltooid en direct gevolgd door de tweede rijpingsdeling. De delingsprodukten van de eerste rijpingsdeling worden secundaire spermatocyten genoemd; de delingsprodukten van de tweede rijpingsdeling spermatiden. De spermatiden differentiëren zich zonder verdere deling tot zaadcel.

Bij de rat begint de differentiatie tot spermatogonium van het type A op de 4de dag na de geboorte. De eerste primaire spermatocyten kunnen vanaf de 15de dag na de geboorte worden waargenomen. Ongeveer 45 tot 50 dagen na de geboorte zijn de eerste zaadcellen waarneembaar (Monesi 1972). Een schematisch overzicht van oögenese en spermatogenese is gegeven in figuur 2-14.

De eerste stadia van de profase vinden bij vrouwelijke zoogdierkiemcellen alleen gedurende de embryonale periode plaats. Daarna vindt er geen celdeling meer plaats waardoor het aantal vrouwelijke kiemcellen zou kunnen toenemen.



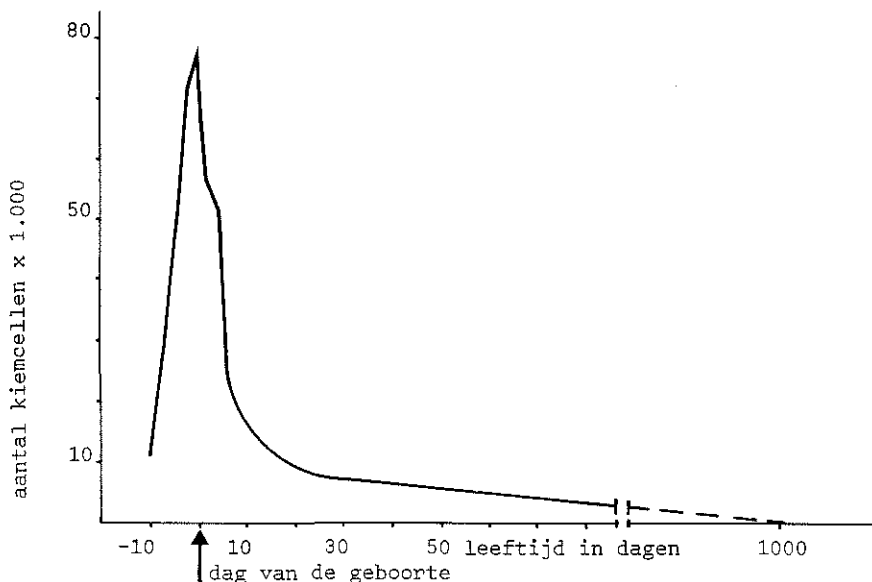
figuur 2-14. Schematisch overzicht van spermatogenese en oögenese. c geeft de hoeveelheid DNA per cel aan.

Het aantal primaire oöcyten neemt na de profase van de eerste rijpingsdeling slechts af door atresie of door follikelontwikkeling. Bij het mannelijke dier worden na de rustfase uit de spermatogonia A steeds opnieuw spermatogonia A gevormd zodat het aantal stamcellen waaruit zaadcellen gevormd worden onbeperkt is. De eerste rijpingsdeling en de daaraan voorafgaande profase kan bij het mannelijke dier vanaf het begin van de puberteit tot het einde van het leven van het dier worden waargenomen.

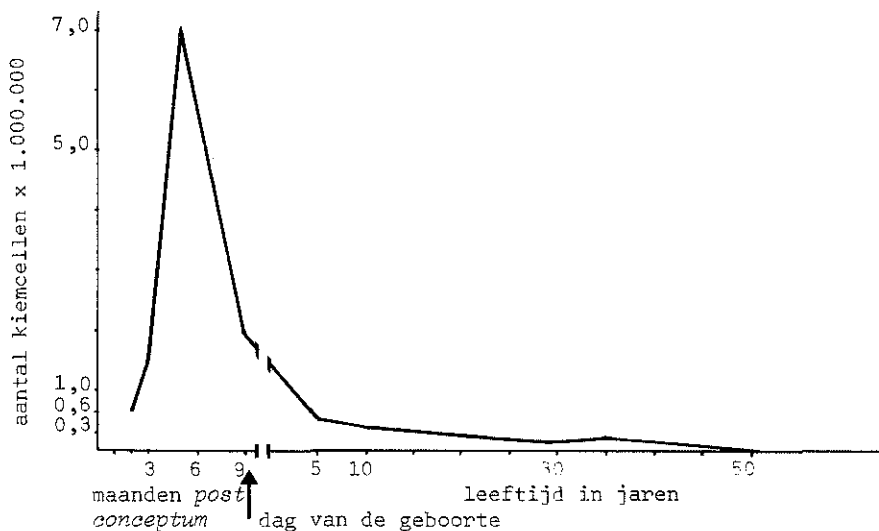
In de oöcyt vindt synthese en opslag van RNA dat nodig is voor de rijpingsdeling en de eerste stadia van de embryonale ontwikkeling gedurende de profase van de eerste rijpingsdeling plaats. In de mannelijke kiemcel vindt eveneens een dergelijk proces plaats. Gedurende de profase van de eerste rijpingsdeling wordt getritieerd uridine zeer actief geïncorporeerd. Er vindt een actieve RNA-synthese plaats. Dit RNA wordt in het cytoplasma van de spermatocyt opgeslagen. Na voltooiing van de tweede rijpingsdeling wordt er geen getritieerd uridine meer geïncorporeerd, blijkbaar wordt er geen RNA meer gesynthetiseerd. Na de tweede rijpingsdeling vindt er ondanks het feit dat er geen RNA gesynthetiseerd wordt toch differentiatie van spermatide tot zaadcel plaats. Aangenomen wordt dat dit mogelijk is dankzij het RNA dat gedurende de profase van de eerste rijpingsdeling gesynthetiseerd is en in het cytoplasma van de spermatocyt is opgeslagen (Monesi 1972).

#### 2.10. Atresie van kiemcellen.

In figuur 2-15 is het verloop in de tijd van het totale aantal van de kiemcellen bij vrouwelijke ratten en mensen afgebeeld. Aanvankelijk is er, in de embryonale fase, een snelle toename, gevolgd door een snelle afname.



figuur 2-15a. Gemiddeld aantal kiemcellen dat zich tussen 8 dagen voor de geboorte en 1000 dagen na de geboorte in de ovaria van een rat bevindt (Beaumont en Mandl 1962).



figuur 2-15b. Gemiddeld aantal kiemcellen dat zich van 2 maanden na de conceptie tot 50 jaar na de geboorte in de ovaria van een vrouw bevindt (Baker 1972).

Daarna vindt gedurende de rest van het leven een geleidelijke afname plaats. De snelle toename wordt veroorzaakt door delingen van oerkiemcellen en oögonia en neemt een einde als de oögoniale delingen, tengevolge van differentiatie van oögonia naar oöcyten, ophouden. De snelle afname van het aantal kiemcellen wordt veroorzaakt door atresie van een groot deel van de pas gevormde oöcyten. Deze atresie is zo massaal dat tot voor kort verondersteld werd dat mogelijk alle embryonale kiemcellen verdwijnen (Hargitt 1925, 1930, Stieve 1917). De definitieve oöcyten zouden dan pas later in het epitheel van het ovarium, dat om deze reden kiemepitheel genoemd werd, ontstaan (Latta en Pederson 1944). Pas in de zestiger jaren werd definitief bewezen dat de oöcyten die tijdens de volwassen leeftijd in het ovarium aangetroffen worden inderdaad afkomstig zijn van de embryonale kiemcellen (2.3).

In de embryonale fase verdwijnen de meeste oöcyten als zij in de eerste stadia van de profase van de eerste rijpingsdeling zijn. Een voorwaarde voor de goede afloop van de profase is waarschijnlijk het complementair zijn van de homologe chromosomen. Indien dit niet het geval zou zijn dan zou de chromosomale paring niet goed kunnen verlopen, hetwelk tot atresie van de kiemcel zou leiden (Ohno 1967). Een duidelijke illustratie hiervan vormen de bastaarden van paard en ezel en die van paard en zebra. De chromosomen van deze soorten zijn niet complementair. Als de kiemcellen van deze bastaarden in de profase van de eerste rijpingsdeling komen volgt een vrijwel totale atresie van alle kiemcellen (Taylor en Short 1973). Dit is de oorzaak van de steriliteit van muil dieren, muilezels en paard-zebra bastaarden.

Een andere oorzaak van de atresie van pas gevormde oöcyten wordt genoemd door Ohno en Smith (1964). Zij bestudeerden foetale runderovaria en bemerkten dat oöcyten die niet omgeven zijn door voldoende follikelcellen niet in de rustfase van de profase komen maar de rijpingsdeling

vervolgen. Ook dit zou tot atresie leiden. De massale atresie heeft dus als mogelijke oorzaken: het niet-complementair zijn van de homologe chromosomen en de afwezigheid van een gesloten follikelwand.

De geleidelijke afname van het aantal oöcyten vindt voornamelijk gedurende de volwassen leeftijd plaats. Bij de meeste dieren bevat het ovarium nog oöcyten als het dier van ouderdom sterft. Bij de mens wordt het aantal zeer gering of nul. Verondersteld wordt dat dit de oorzaak van de menopauze is. De gemiddelde menopauzeleeftijd is ongeveer vijftig jaar (Jaszmán 1973). De eerste menstruaties komt ongeveer omstreeks het twaalfde levensjaar. Er komen dus maximaal plusminus  $(50-12) \times 13 = 494$  oöcyten gedurende een mensenleven vrij. Aan het begin van de puberteit heeft een vrouw ongeveer 500.000 oöcyten. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het aantal oöcyten in het ovarium voornamelijk op andere wijze dan door ovulatie afneemt. Volgens Pederson (1972) is na de juveniele periode atresie van primordiale follikels een zeldzaam verschijnsel. De geleidelijke afname van het aantal oöcyten zou veroorzaakt worden door primordiale follikels die met follikelontwikkeling beginnen en gedurende deze ontwikkeling atretisch worden.

De afname van het aantal oöcyten wordt mogelijk ook veroorzaakt door ophoping van "residual bodies" in het cytoplasma van de oöcyt (2.7.2). Een teveel aan "residual bodies" zou tot celdood, tot dood door veroudering, kunnen leiden (E. Anderson 1972). De uiteindelijke snelheid waarmee het aantal oöcyten bij de mens afneemt zou dan veroorzaakt kunnen worden door twee processen: afname van het aantal oöcyten door follikelontwikkeling en afname door atresie door een teveel aan "residual bodies".

Jones en Krohn (1961b) telden het aantal oöcyten bij muizen van verschillende leeftijd, die een hypofyse *in situ* hadden of die gehypofysectomeerd waren. Het bleek dat de snelheid waarmee het aantal oöcyten in hypofysose

muizen afnam kleiner was dan bij muizen met een hypofyse. Door hypofysectomie verdwijnen de gonadotrope hormonen. Het aantal follikels dat met de ontwikkeling begint of de snelheid waarmee het aantal oöcyten afneemt is blijkbaar gedeeltelijk van deze hormonen afhankelijk. Jones en Krohn (1961a) telden eveneens de oöcyten in ovaria van maagdelijk gebleven muizen en van muizen die vaak zwanger geweest waren. Zij kwamen tot de conclusie dat de snelheid waarmee het aantal oöcyten in beide groepen afnam niet verschillend was. Pederson en Peters (1971) zijn echter van mening dat het aantal primordiale follikels dat met de ontwikkeling begint bij zwangere muizen kleiner is dan bij niet-zwangere muizen. Het verschil in mening wordt waarschijnlijk veroorzaakt door verschil in werkwijze. Pederson telde het aantal follikels dat per dag met de ontwikkeling begon. Jones en Krohn telden het totaal aantal oöcyten dat per dier aanwezig was. De individuele variatie in het totaal aantal oöcyten kan veel groter zijn dan het aantal follikels dat door de zwangerschappen rustend is gebleven. De waarnemingen van Pederson en Peters (1971) laten de mogelijkheid open dat gebruik van die anticonceptieve pil, die een vermindering van afgifte van gonadotrope hormonen tot gevolg heeft, een minder snelle uitputting van de voorraad oöcyten tot gevolg zal hebben. Dit zou dan mogelijk een verhoging van de gemiddelde leeftijd waarop de menopauze in zal treden tot gevolg hebben.

### Hoofdstuk 3. Inleiding experimenteel gedeelte.

Een niet-zwangere rat heeft onder laboratoriumomstandigheden in de regel een vier- of vijfdaagse ovariële cyclus; iedere vier of vijf dagen vindt ovulatie plaats. De generatie grootste follikels springt en per follikel komt een gerijpte eicel vrij. De gesprongen follikel ontwikkelt zich tot corpus luteum (Pederson 1951). Rondom de periode waarin de ovulatie optreedt is het dier bronstig. Het cyclisch weerkerende bronstgedrag was veel eerder bekend dan de ovariële cyclus. Dit is de reden dat de dagen van de ovariële cyclus namen dragen van de bronst-cyclus. De relatie tussen bronst- en ovariële cyclus werden door Long en Evans (1922) opgehelderd.

De follikelsprong vindt bij de rat in de vroege ochtend ( $\pm$  01.00 - 02.30 uur) van de oestrusdag plaats (Everett 1948). De follikelsprong wordt geïnduceerd door gonadotrope hormonen die in een vrij grote hoeveelheid in een korte tijd (piek secretie, gonadotropine piek) gedurende de namiddag van de pro-oestrus-dag worden afgescheiden. Na het springen van de generatie grootste follikels ontwikkelt zich een nieuwe generatie sprongrijpe follikels, een generatie follikels waarin onder invloed van de gonadotropine piek oöcytrijping, follikelsprong en luteïnisatie plaatsvinden (Mandl en Zuckerman 1952, Welschen 1972).

Gedurende het ontwikkelingsproces tot sprongrijpe follikels neemt de hoeveelheid oestrogene hormonen, welke door het ovarium gesecerneerd worden, toe (Brown-Grant et al 1970, Butcher et al 1974). Na de aanvang van de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen stopt de secretie van oestrogene hormonen en komt die van progesteron op gang (Oxender et al 1971, Shaikh en Harper 1972, Labhsetwar et al 1973). De cellen van het vagina-epitheel veranderen gedurende de ovariële cyclus (Long en Evans 1922).



Deze veranderingen vinden plaats onder invloed van de hormonale activiteit van het ovarium (Allen 1922, Barker en Walker 1966). Met behulp van dagelijks genomen vagina-uitstrijkjes is de ovariële cyclus te vervolgen.

De pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen geschiedt onder invloed van verhoogde secretie van een uit het centrale zenuwstelsel afkomstig hormoon. De afgifte van dit hormoon kan met behulp van bepaalde farmaca, waaronder Nembutal (pentobarbital), geblokkeerd worden. Dit heeft tot resultaat dat de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen geen doorgang vindt. De periode gedurende welke de pre-ovulatoire afgifte geblokkeerd kan worden, wordt kritische periode genoemd (Everett en Sawyer 1950, Everett 1961, 1964). Van de mogelijkheid om de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen te blokkeren wordt bij het onderzoek naar de regulatie van de ovariumfunctie veelvuldig gebruik gemaakt. De onderzoeker kan na blokkade van de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen zonder interferentie door deze hormonen de eigenschappen van pre-ovulatoire follikels onderzoeken.

In het onderzoek naar de regulatie van de ovariumfunctie wordt het optreden van follikelsprong beschouwd als indicatie van de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen. In die gevallen waar follikelsprong moeilijk vast te stellen is wordt de aanwezigheid van corpora lutea als indicator van de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen beschouwd (Quinn 1966, Moll en Zeilmaker 1966). Voorzover bekend is nog nooit onderzocht in hoeverre rijping van eicellen als kenmerk van de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen kan worden gebruikt (a).

Follikelsprong vindt bij de rat, de muis en het konijn tussen tien en vijftien uur na de afgifte of injectie van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen plaats (Pincus en Enzmann 1935, Edwards en Gates 1959,

Holsinger en Everett 1972). De hervatting van de eerste rijpingsdeling is bij deze dieren ongeveer twee tot drie uur na de afgifte van gonadotrope hormonen waarneembaar (Ayalon et al 1972, Edwards en Gates 1959, Pincus en Enzmann 1935). De rijpingsdeling wordt twee tot drie uur na de aanvang van de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen hervat. Reeds na twee tot drie uur zou met behulp van de rijpingsdeling vastgesteld kunnen worden dat deze pre-ovulatoire afgifte begonnen is (b). Dit kan als het dier na het experiment geringe overlevingskansen heeft, een groot voordeel betekenen (zie bijvoorbeeld Cross en Dyer 1971). Om de genoemde redenen (a en b) werd onderzocht of met behulp van de voltooiing van de eerste rijpingsdeling de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen vastgesteld kan worden. De bruikbaarheid van het optreden van oöcytrijping als index voor de afgifte van gonadotrope hormonen werd vervolgens vergeleken met die van follikelsprong en corpus luteum vorming (hoofdstukken 5 en 6).

In de rijpingsdeling zijn een aantal duidelijke stadia te onderscheiden (Pincus en Enzmann 1935). Het is echter niet bekend of deze stadia vaste tijdsrelaties tot elkaar en tot het moment van inductie van de eerste rijpingsdeling hebben. Tsafiriri en Kraicer (1972) bijvoorbeeld, zijn van mening dat bij de rat geen vaste tijdsrelatie bestaat tussen het moment waarop de eerste rijpingsdeling begint (verdwijnen van de kern van de oöcyt) en het moment waarop de eerste rijpingsdeling voltooid is (af-snoering eerste poollichaampje). Tot nu toe is bij de rat geen onderzoek gedaan dat een dergelijke uitspraak over het tijdschema van het verloop van de eerste rijpingsdeling rechtvaardigt. Indien er een vaste tijdsrelatie bestaat tussen het tijdstip van serum gonadotropine stijging en de rijpingsdeling, dan zou met behulp van de rijpingsdeling bepaald kunnen worden wanneer de afgifte van de gonadotrope hormonen plaatsgevonden heeft (hoofdstuk 5).

In de hoofdstukken 5 en 6 zijn oöcytrijping, luteïnisatie en follikelsprong als drie op zichzelf staande processen beschouwd die slechts met elkaar gemeen hebben dat zij min of meer gelijktijdig door gonadotrope hormonen geïnduceerd worden. In de literatuur wordt het bestaan van een aantal onderlinge relaties tussen follikel, oöcyt en corpus luteum geopperd. Zo zou luteïnisatie mogelijk zijn dankzij de follikelsprong; het verdwijnen van de oöcyt zou luteïnisatie mogelijk maken (El-Fouly et al 1970). De follikel zou intact blijven dankzij de aanwezigheid van de oöcyt en de oöcyt zou intact blijven dankzij het contact tussen follikelceluitlopers en oölemma (Baker en Neal 1972). Uit de veelheid van de relaties die tussen zich in het ovarium afspelende processen denkbaar zijn werden er twee nader bekeken.

Onder bepaalde omstandigheden bleek het mogelijk oöcytrijping te induceren waarna de follikel degenereerde in plaats van luteïniseerde (hoofdstuk 6). Dit leidde tot een nader onderzoek naar de relatie tussen gonadotrope behandeling, oöcyt en follikel (hoofdstuk 7).

Een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen induceert naast de reeds genoemde processen (oöcytrijping, follikelsprong en luteïnisatie) een verandering in de steroïdsecretie van het ovarium. De secretie van progesteron behoort tot de eerst waarneembare verschijnselen na de aanvang van de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen (Oxender et al 1971). Rondell (1974) heeft aangetoond dat bij het konijn progesteron voor de follikelsprong noodzakelijk is. Bij amfibieën induceert progesteron zowel de hervatting van de rijpingsdeling als de follikelsprong (Schuetz 1974). Verondersteld wordt dat bij de kikvors de enige functie van een verhoogde pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen inductie van progesteron-synthese is (Schuetz 1974). De rol van progesteron bij de inductie van de rijpingsdeling bij zoogdieren zou met die van de kikvors te vergelijken zijn.

Tot nu toe ontbreekt het experimentele bewijs (Schuetz 1974). In hoofdstuk 8 wordt nader ingegaan op de relatie steroïd-synthese en inductie van de rijpingsdeling.

De experimentele gedeelten hebben als centraal punt de rijpingsdeling. Daarom werd een gedegen kennis van de morfologie van de eerste rijpingsdeling noodzakelijk geacht voor het experimentele werk. In hoofdstuk 4 wordt dan ook de morfologie van de rijpingsdeling beschreven.

## Hoofdstuk 4. Morfologie van de rijpingsdeling.

### 4.1. Inleiding.

Het was reeds lang bekend dat aan de follikelsprong de oöcytrijping (van Beneden 1875) voorafgaat. Bij dieren, waar ovulatie door copulatie geïnduceerd wordt, zoals bijvoorbeeld het konijn, kunnen na copulatie rijpende oöcyten aangetroffen worden. Van Beneden (1875) en ook Pincus en Enzmann (1935), die een vrij volledige beschrijving gaven van de rijpingsdeling, deden hun waarnemingen aan de konijne-oöcyt. Bij dieren, waar ovulatie spontaan plaatsvindt, zoals bij de rat, is het moeilijker om rijpende oöcyten te vinden. Nadat het inzicht in het verloop van de ovariële cyclus en het optreden van ovulaties bij de vrouwelijke rat toegenomen was werd gericht zoeken naar rijpende oöcyten mogelijk. De publikaties van Odor (1955) en Mandl (1963) zijn hier voorbeelden van. Odor relateerde het verloop van de rijpingsdeling aan het optreden van bronstgedrag. Mandl (1963) relateerde het verloop van de rijpingsdeling aan het moment van de follikelsprong en aan de licht- en donkerperioden zoals deze waren in een natuurlijke omgeving en onder laboratoriumomstandigheden. Follikelsprong en in de regel ook bronstgedrag volgen na de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen. Het optreden van bronstgedrag of follikelsprong zijn echter geen nauwkeurige indicatoren voor het tijdstip waarop de afgifte van pre-ovulatoire hormonen aanvangt (Holsinger en Everett 1972).

In het werk van Odor en Mandl ontbreekt een scherpe definiëring van de grenzen tussen de verschillende stadia. Deze grenzen zijn voor het bepalen van het tijdschema van het verloop van de rijpingsdeling noodzakelijk. In dit hoofdstuk worden deze grenzen gedefinieerd. Overigens wordt de terminologie van Odor en Mandl gebruikt.

## 4.2. Materiaal en methode.

De verschillende stadia werden beschreven met behulp van ovaria, die afkomstig waren van de in hoofdstuk 5 beschreven ratten.

## 4.3. Resultaten.

### 4.3.1. Kiemblaasstadium.

De pre-ovulatoire follikel bestaat uit een holte, een antrum, welke begrensd wordt door de membrana granulosa. De membrana granulosa wordt omgeven door de theca interna en de theca externa. De oöcyt ligt in een verdikking van de membrana granulosa, die cumulus oöphorus wordt genoemd. De oöcyt is rond tot ovaal van vorm. Zij wordt omgeven door een zona pellucida, die ongeveer  $13\mu$  dik is. De oöcyt is ongeveer  $70\mu$  in diameter (de zona niet meegerekend). De oöcyt bevat een centraal of vrijwel centraal gelegen kern of kiemblaas die ongeveer  $25\mu$  in diameter is (figuur 4-1). In de kern zijn enige chromatinebolletjes, chromatinedraadjes en een nucleolus zichtbaar. Overigens maakt de kern optisch een lege indruk. Het chromatinemateriaal ligt voornamelijk tegen het kernmembran. De nucleolus bevat een grote centrale vacuole. In de wand van de nucleolus zijn vaak nog kleine vacuoli aanwezig (figuur 4-1).

De eerste verschijnselen van de hervatting van de rijpingsdeling kunnen in de schil van de nucleolus worden waargenomen (figuur 4-2). In die schil verschijnen korrelige structuren die duidelijk de contouren van chromosomen krijgen. Deze fase werd meestal waargenomen in ovaria die reeds oöcyten in het chromatine-massa-I-stadium bevatten.

Hieruit is geconcludeerd dat de periode waarin chromosomen tegen de nucleolus zichtbaar zijn slechts kort is.

#### 4.3.2. Chromatine-massa-I-stadium.

De nucleolus valt in elkaar en vormt een chromatinebolletje van ongeveer  $5\mu$  in diameter. Dit chromatinebolletje kleurt sterk basofiel. Het is centraal in de oöcyt gelegen. De kernmembraan valt ongeveer gelijktijdig in elkaar. Het chromatinebolletje wordt omgeven door flarden en blaasvormige structuren, welke de restanten zijn van de kernmembraan. De figuren 4-1, 4-2 en 4-3 laten de overgang van kiemblaasstadium naar chromatine-massa-I duidelijk zien. Tussen de restanten van de kernmembraan en chromatine-massa is een niet gekleurde laag zichtbaar die, naarmate de oöcyt langer in het chromatine-massa-I-stadium is, verdwijnt (figuren 4-3, 4-4). In het vroege chromatine-massa-I-stadium is er nauwelijks structuur in het chromatinebolletje te zien (figuur 4-4). Het heeft een onregelmatig oppervlak. Naarmate de tijd vordert komt er meer structuur (figuren 4-5, 4-6) in. Het bolletje wordt minder compact, de chromatine-massa valt in een paar brokken uiteen, waarna individuele chromosomen zichtbaar worden. Soms ontrolt de chromatine-massa zich als een snoer waarvan de kralen gevormd worden door de chromosomen (figuur 4-5).

#### 4.3.3. Diakinese-stadium.

Het diakinese-stadium wordt gekenmerkt door individuele compacte chromosomen die in het centrum van een sterachtig figuur liggen. Deze sterachtige figuur wordt gevormd door de restanten van het kernmembraan die uit blaasjes en dubbel gevouwen fragmenten bestaan. In de figuren 4-6, 4-7

worden een aantal voorbeelden van oöcyten in diakinese-stadium gegeven. Ten tijde van het diakinese-stadium verhuizen de in het centrum gelegen chromosomen in de richting van de periferie van de oöcyt (figuren 4-6, 4-7).

De chromatine-massa I desintegreert geleidelijk tot individuele compacte chromosomen, die kenmerkend zijn voor het diakinese-stadium. Ter wille van de klassificatie van de verschillende stadia is er een grens getrokken tussen het chromatine-massa I en diakinese-stadium. Een oöcyt werd geacht zich in het diakinese-stadium te bevinden als tenminste één individuele chromosoom zichtbaar was.

Temidden van de restanten van het kernmembraan ontstaan weinig gerichte draden van de kernspoel. Hierdoor krijgt de sterachtige figuur extra stralen.

#### 4.3.4. Metafase-I-stadium.

De metafase I wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een kernspoel met chromosomen en de afwezigheid van restanten van het kernmembraan. In de metafase I zijn drie in elkaar overgaande fasen te onderscheiden: de vroege metafase, de metafase en de late metafase.

De vroege metafase I is herkenbaar aan een afgeronde kernspoel met verspreid liggende chromosomen (figuur 4-8). De kernspoel ligt in de buurt van het vitelline membraan.

De metafase I wordt gekenmerkt door een op doorsnede ruitvormige kernspoel met chromosomen die min of meer in een metafaseplaat gerangschikt zijn (figuren 4-9, 4-10, 4-11). De chromosomen komen in het midden van de kernspoel te liggen, waarna het lengen van de chromosomen langs de trekdraden begint (figuur 4-12). De scheiding van de chromosomen verloopt niet volledig synchroon. Sommige bevinden zich nog niet in het midden van de kernspoel terwijl anderen reeds langs de trekdraden lengen. Van een echte



metafaseplaat is vaak geen sprake. De kernspoel ligt in dit stadium over zijn gehele lengte tegen het vitelline membraan. Op de plaats waar de kernspoel tegen het vitelline membraan ligt, vormt zich een uitstulping.

De late metafase wordt gekenmerkt door chromosomen die zich reeds lengen voordat een volledige scheiding heeft plaatsgevonden. De kernspoel gaat wentelen, zodat kernspoel en vitelline membraan niet meer volledig parallel liggen.

#### 4.3.5. Anafase-stadium.

Gedurende de anafase vindt een volledige scheiding van de homologe chromosomen plaats (figuren 4-13, 4-14, 4-15). Een oöcyt is in de anafase als twee duidelijke groepen chromosomen waarneembaar zijn. Een volledige scheiding van alle chromosomen is hiervoor niet noodzakelijk. Tijdens de anafase wentelt de kernspoel. Het draaipunt is het midden van de kernspoel, gelegen tegen het vitelline membraan. Dit stukje kernspoel en vitelline membraan lijken aan elkaar vast te zitten. De kernspoel komt loodrecht op het vitelline membraan te staan. Het gedeelte van de kernspoel dat zich naar buiten wentelt, komt in een uitstulping van het vitelline membraan, het toekomstige poollichaampje, te liggen. Als de kernspoel loodrecht op het vitelline membraan staat, sluit het midden van de kernspoel de opening tussen oöplasma en de uitstulping, die het toekomstig poollichaampje zal worden, af. In de kernspoel wordt het zogenaamde tussenlichaam zichtbaar; dit is een verdikking van de trekdraden in het vroegere metafaseplaatgebied (figuur 4-16).

#### 4.3.6. Telofase-stadium.

In het telofase-stadium vindt verplaatsing van de chromosomen naar de einden van de kernspoel plaats waarna de chromosomen opgaan in twee chromatine-massa's, waarin geen individuele chromosomen meer te onderscheiden zijn (figuren 4-16, 4-17, 4-18). De kernspoel was in de metafase spoelvormig, in de telofase wordt deze cilindervormig. De trekdraden lopen parallel met elkaar. In het nog vastzittende poollichaampje vormt het chromatine een plaat en in de oöcyt vormt het een bolletje (figuur 4-18).

#### 4.3.7. Chromatine-massa-II-stadium.

Het poollichaampje is in dit stadium losgekomen van de oöcyt. In het poollichaampje worden chromosomen zichtbaar. In de oöcyt ligt het chromatine in een bolletje tegen de ruwe afdichting, de plaats waar het poollichaampje afgesnoerd is. Het chromatine-bolletje ligt in een dradige structuur (figuur 4-19).

#### 4.3.8. Metafase-II-stadium.

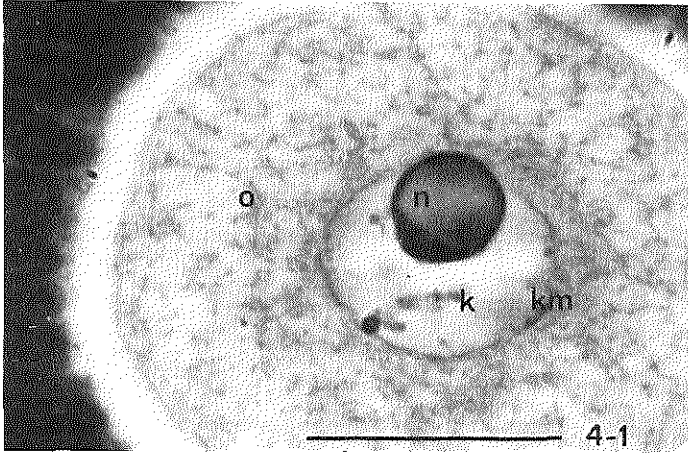
Het chromatine-bolletje differentieert zich in dit stadium tot individuele chromosomen die verspreid liggen in de kernspoel (vroeg metafase II) (figuur 4-20). De kernspoel ontwikkelt zich uit de dradige structuur waarin zich het chromatine-bolletje bevond. De chromosomen vormen dan een duidelijke metafaseplaat. De kernspoel ligt over zijn gehele lengte tegen het vitelline membraan (figuur 4-21). Een oöcyt wordt geacht zich in metafase II te bevinden als individuele chromosomen zichtbaar zijn.

#### 4.4. Discussie.

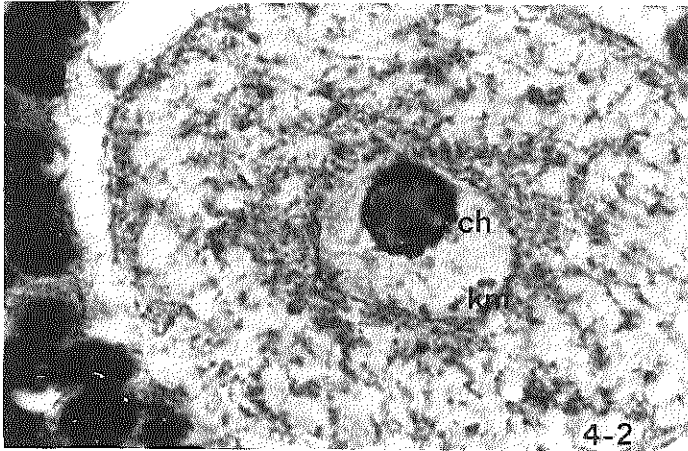
Het eerste kenmerk van een oöcyt die de rijpingsdeling hervat is het zichtbaar worden van chromosomen tegen de wand van de nucleolus. Het chromatine van de ratte-oöcyt moet blijkbaar voordat kernmembraan en nucleolus in elkaar vallen zich in of nabij de nucleolus bevinden. Dit komt overeen met de waarnemingen van Austin (1961) en Tsafriri en Kraicer (1972) die rondom de nucleolus een DNA-ring waarnamen.

Bij de rijpingsdeling van oöcyten van andere zoogdieren zoals muis, mens, konijn en veldmuis vindt er een condensatie van chromosomen plaats op het membraan van een tegen de celwand gelegen kern (Austin en Walton 1956, Edwards en Gates 1959, Pincus en Enzmann 1935, Cross 1971). De rat vormt een duidelijke uitzondering. Condensatie van de chromosomen vindt plaats tegen de wand van de nucleolus, waarna nucleolus en de centraal gelegen kern in elkaar vallen. Pas daarna vindt verplaatsing van het chromatinemateriaal naar de periferie plaats. Bij de bovengenoemde soorten verdwijnt het kernmembraan aan het einde van het diakinese-stadium. Bij de rat vindt in een zeer vroeg stadium een in elkaar vallen van het kernmembraan plaats maar ook bij de rat verdwijnen de restanten van het kernmembraan pas aan het einde van het diakinese-stadium. In de literatuur wordt over het verdwijnen van de kiemblaas gesproken. Bij de rat verdwijnt de vorm van de kiemblaas (einde kiemblaas-stadium) weliswaar doch het duurt aanzienlijk langer voordat ook het membraan van de kiemblaas verdwenen is (einde diakinese-stadium).

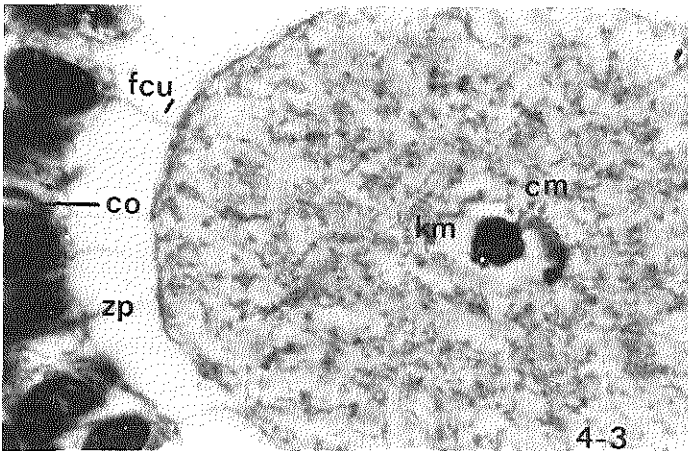
Voor de beschrijving van een tijdschaal van de rijpingsdeling zijn duidelijk gedefinieerde stadia een voorwaarde. De overgang van kiemblaas-stadium naar chromatine-massa I geschiedt snel. Het aangeven van een grens tussen deze twee stadia is gemakkelijk. De andere stadia gaan echter geleidelijk in elkaar over. Vandaar dat er grenzen gedefinieerd zijn die mogelijk een wat arbitrair karakter dragen.



kiemblaas-stadium, k= kern, km= kernmembraan, n= nucleolus, o= oöplasma.

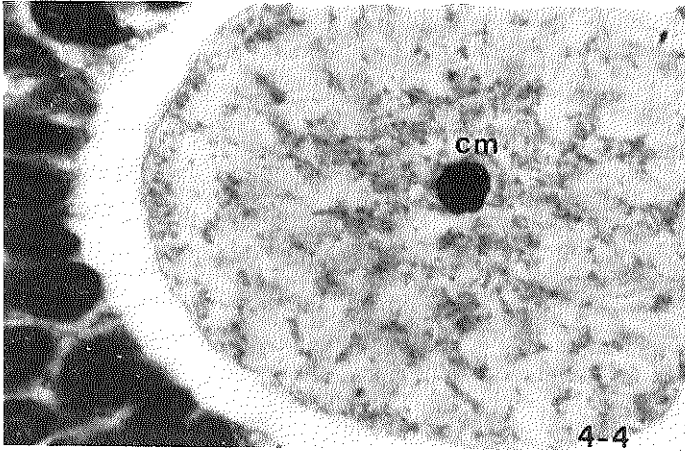


kiemblaas-stadium, ch= chromosomen in de schil van de nucleolus, km= kernmembraan.

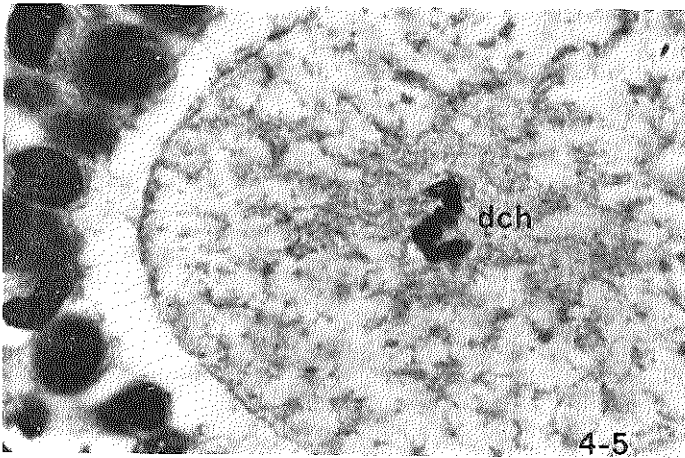


chromatine-massa-I-stadium, cm= chromatine massa, km= kernmembraan, fcu= follikelceluitloper, co= cumulus oöphorus, zp= zona pellucida.

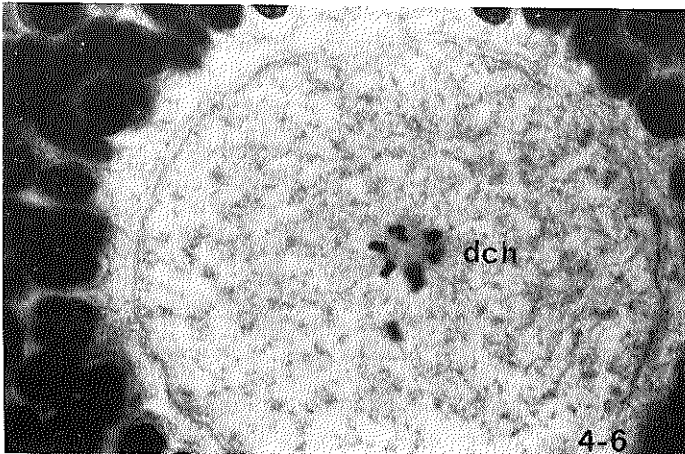
figuren 4-1 t/m 4-21 zijn van dezelfde vergroting, de zwarte staaf in figuur 4-1 geeft 25µ weer.



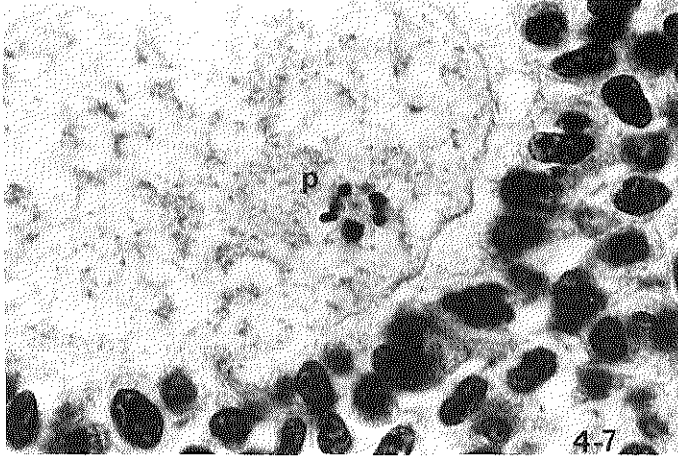
chromatine-mas-  
sa-I-stadium,  
cm= chromatine-  
massa.



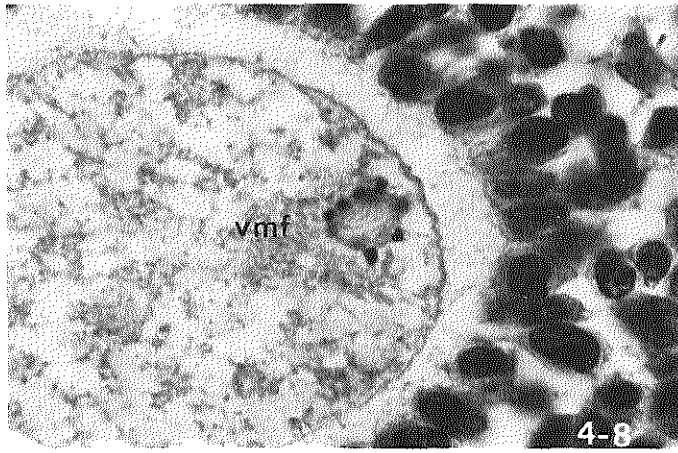
diakinese-sta-  
dium, dch= dia-  
kinese-chromo-  
somen.



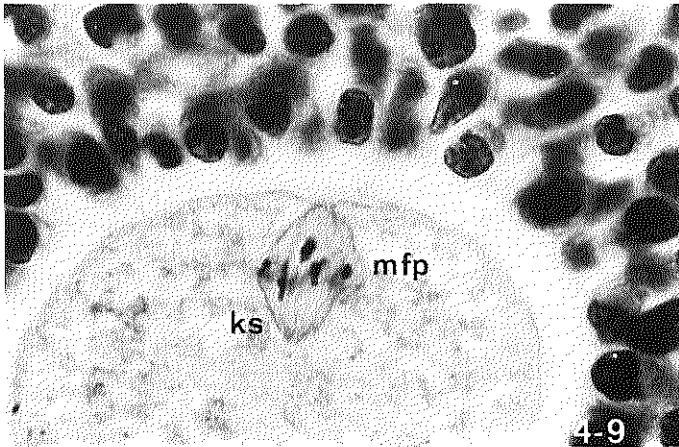
diakinese-sta-  
dium, dch= dia-  
kinese chromo-  
somen.



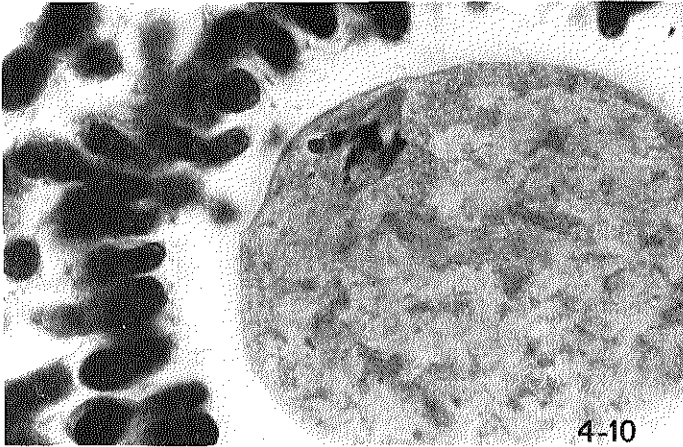
diakinese-stadium, p= perifereer gelegen diakinese chromosomen.



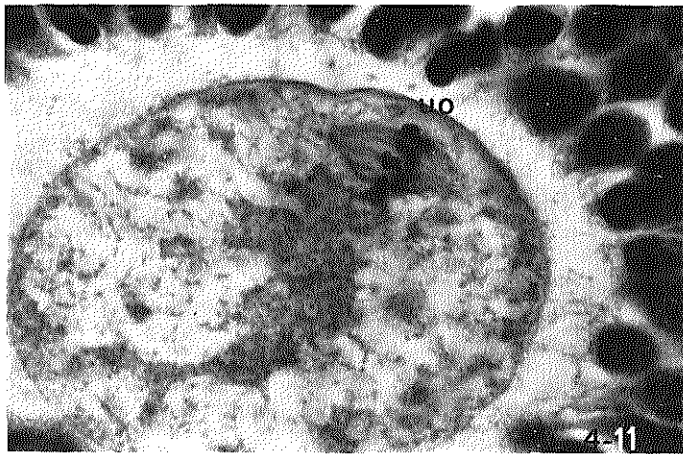
metafase I, vmf= vroegge metafase kernspoel.



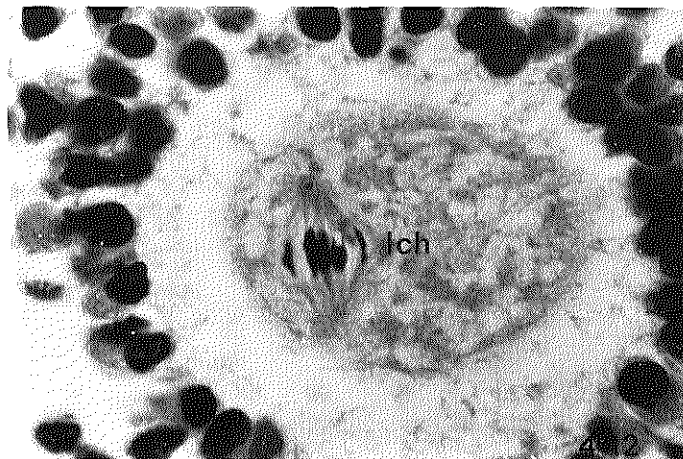
metafase I, ks= kernspoel, mfp= metafaseplaat.



metafase I.



metafase I,  
uo= uitstulping  
oölemma.

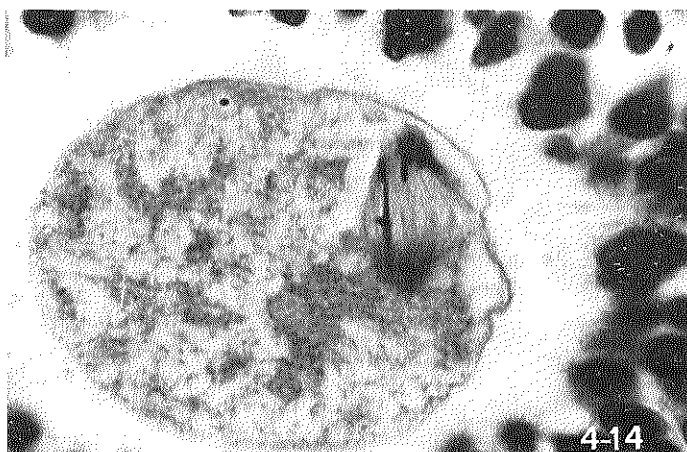


metafase I,  
late metafase,  
lch= lengende  
chromosomen.

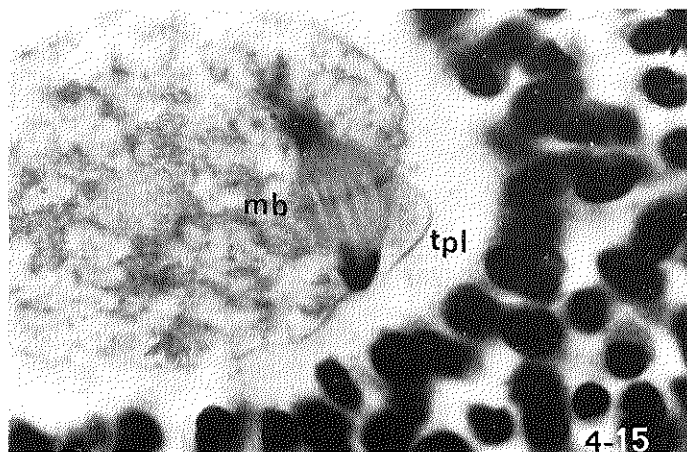




anafase.



anafase.

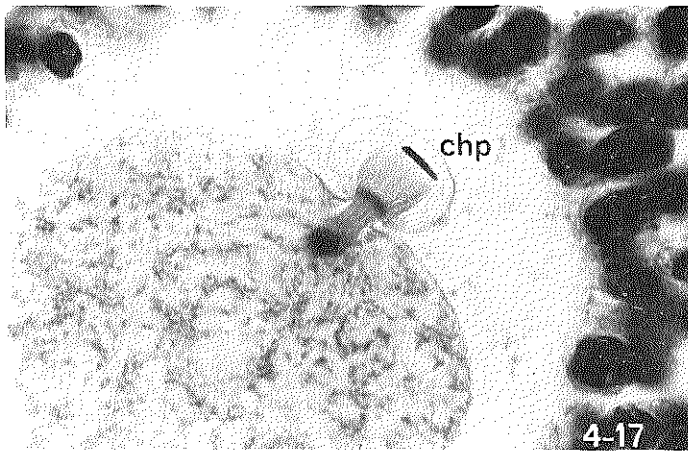


telofase,  
mb= midbody,  
tpl= toekomstig  
poollichaampje.

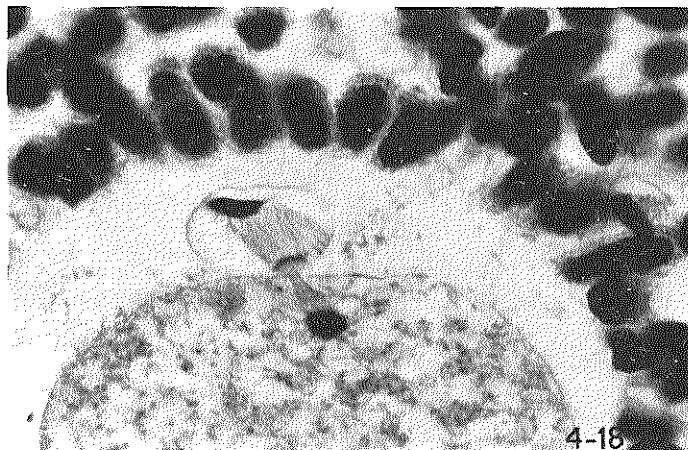




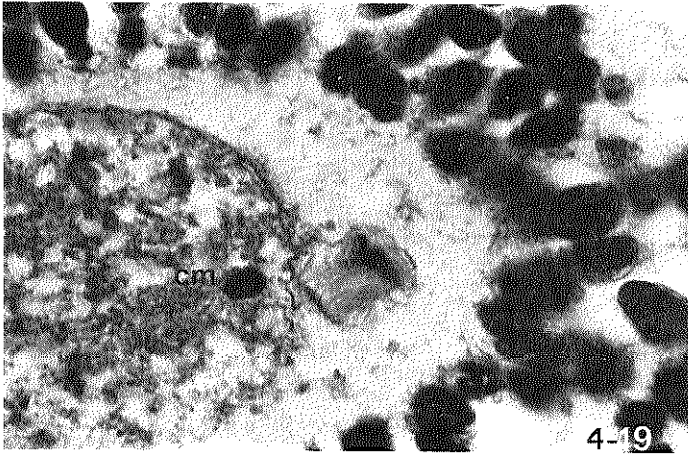
telofase,  
tpl= toekomstig  
poollichaampje.



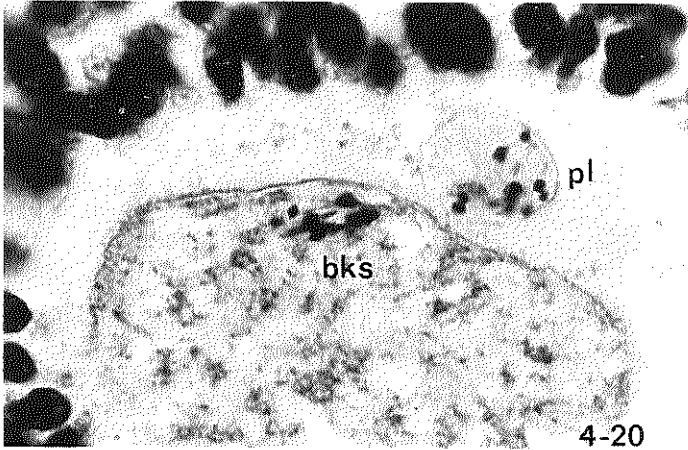
telofase,  
chp= chromatine  
plaat.



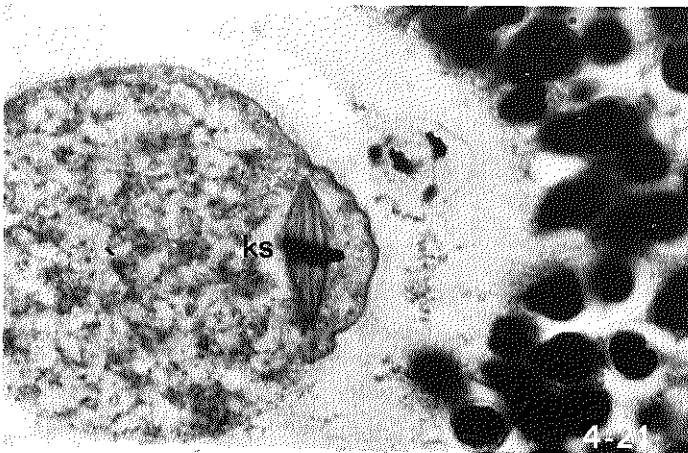
telofase,  
late telofase,  
poollichaampje  
is vrijwel  
afgesnoerd.



chromatinemas-  
sa-II-stadium.  
Poollichaampje  
is afgesnoerd,  
cm= chromatine  
massa.



metafase II,  
vroege metafase  
II, bks= begin  
kernspoel, pl=  
poollichaampje  
met verspreid  
liggende chro-  
mosomen.



metafase II,  
ks= kernspoel.

## Hoofdstuk 5. Tijdschema van de eerste rijpingsdeling.<sup>1)</sup>

### 5.1. Inleiding.

Het tijdschema van het verloop van de eerste rijpingsdeling bij de rat is tot nu toe in drie publikaties beschreven: Odor (1955), Mandl (1963) en Tsafiriri en Kraicer (1972). Odor (1955) beschreef het tijdschema in relatie tot de aanvang van het bronstgedrag; Mandl (1963) in relatie met de follikelsprong en het licht/donker-schema. Tsafiriri en Kraicer (1972) gebruikten als referentiepunt het einde van de kritische periode. Bij de experimenten die in dit hoofdstuk beschreven worden was het tijdstip van inductie bekend. Dit in tegenstelling tot de experimenten beschreven door Odor (1955), Mandl (1963) en Tsafiriri en Kraicer (1972). Verondersteld wordt dat, indien het tijdstip van hormoonafgifte bij individuele dieren bekend is een meer verantwoorde uitspraak over het tijdschema van de rijpingsdeling mogelijk is.

De rijpingsdeling zou een zeer bruikbare index voor de afgifte van een dosis gonadotrope hormonen kunnen zijn, indien het tijdschema onafhankelijk is van de manier waarop de inductie plaatsvindt. Daarom werd onderzocht of het tijdschema van het verloop van de eerste rijpingsdeling bepaald wordt door het type en de dosis gonadotroop hormoon waarmee de inductie geschiedt en tevens werd onderzocht of het tijdschema afhankelijk is van het tijdstip van inductie.

<sup>1)</sup> Dit hoofdstuk is gepubliceerd in *Endocrinology* (Vermeiden en Zeilmaker 1974).

## 5.2. Materiaal en methode.

Deze paragraaf is van algemene aard en heeft tevens betrekking op de experimenten die beschreven zijn in de hoofdstukken 4 t/m 8.

### 5.2.1. Proefdieren.

De proefdieren waren  $F_1$  (R x U) ratten. Zowel R als U zijn ingeteelde Wistar stammen. De dieren waren òf op de afdeling zelf òf in het Centraal Proefdieren Bedrijf van de Medische Faculteit te Rotterdam gefokt. De proefdieren werden gebruikt op een leeftijd van 3 - 6 maanden. De dieren werden met 4 of 5 bij elkaar in een kooi gehouden. De temperatuur in de stal was 20 - 24° C. Het lichtschema was 14 uur licht aan, 10 uur licht uit. Het midden van de donkere periode was 12 uur 's nachts. De dieren hadden vrijelijk de beschikking over water en voer (Hope's farm laboratory diet). Indien cyclische vrouwelijke ratten nodig waren werd van maandag tot en met vrijdag dagelijks een vagina-uitstrijkje gemaakt. De dieren werden gebruikt als zij tenminste twee achtereenvolgende vijfdaagse cycli, direct aan het experiment voorafgaande, hadden vertoond.

In één experiment werden neonataal met androgeen gesteriliseerde vrouwelijke ratten gebruikt. Deze dieren waren op de 5e dag na de geboorte met 1250 µg testosteron propionaat subcutaan geïnjecteerd. Dit heeft tot gevolg dat deze dieren op volwassen leeftijd geen cyclische ovariumactiviteit vertonen (Barraclough 1961, Uilenbroek 1974).

### 5.2.2. Gonadotrope stimulatie.

Gonadotrope stimulatie werd verkregen door middel van een injectie van humaan chorion-gonadotropine (HCG, pregnyl, Organon N.V.), door injectie van een ruw extract van rattehypofyses of door elektrochemische stimulatie van het preoptische gebied in de hersenen. De injecties werden afhankelijk van de proefopstelling intraveneus of intraperitoneaal toegediend. De intraveneuze injecties werden meestal onder ethernarcose verricht in de vena jugularis. Indien op andere wijze verdoofd werd is dit bij het betreffende experiment vermeld.

#### 5.2.2.1. Ruw hypofyse-extract.

Ruw hypofyse-extract werd bereid uit rattehypofyses waarvan de neuro-hypofyses verwijderd waren. Gedurende de verzamelperiode werden de hypofyses bij  $-18^{\circ}$  C bewaard. Nadat er 400 hypofyses verzameld waren werden deze ontdooid en gehomogeniseerd in een porceleinen mortier. Vervolgens werd dit materiaal gedurende vijf minuten aan ultrasone trillingen blootgesteld. Na toevoeging van een fysiologische zoutoplossing werd het homogenaat gedurende 5 minuten gecentrifugeerd met 3000 toeren per minuut. De bovenstaande vloeistof werd verder verdund zodanig dat een concentratie van 2 hypofyses per ml extract werd bereikt. Deze oplossing werd in buisjes van 1 ml diepgevroren bewaard. De extractie-procedure werd onder ijs uitgevoerd.

De hoeveelheid gonadotrope hormonen die het extract van 1 hypofyse bevat is gedefinieerd als 1 RHE (Ratte-Hypofyse-Eenheid). De potentie van 1 RHE is  $6,9 \mu\text{g NIH-LH-S}_1$  en  $140 \mu\text{g NIH-FSH-S}_1$ .\*) Vlak voor gebruik werd een buisje

\*) Bepaald door Dr. J. Uilenbroek.

met hypofyse-extract ontdooid en met een fysiologische zoutoplossing tot de gewenste concentratie verdund.

#### 5.2.2.2. Elektrochemische stimulatie.

Elektrochemische stimulatie werd verricht nadat het dier in een stereotactisch apparaat gefixeerd was. De stimulatie werd eenzijdig in het pre-optisch gebied uitgevoerd met een unipolaire roestvrijstalen elektrode. De niet geïsoleerde punt van de elektrode was 0,5 mm lang en had een diameter van 0,25 mm. De stroomsterkte bedroeg 160  $\mu$ A (gelijkstroom). Deze stroom werd 3 maal gedurende 30 seconden met telkens een tussenpauze van 30 seconden toegediend. Tijdens autopsie werd nagegaan of de punt van de elektrode zich in het pre-optisch gebied bevonden had. Indien dit niet het geval was werd het dier niet tot de proefgroep gerekend.

#### 5.2.2.3. Blokkade van spontane afgifte van endogene ovulatoire gonadotrope hormonen.

Spontane afgifte van endogene ovulatoire gonadotrope hormonen werd voorkomen door een intraperitoneale injectie met Nembutal (33,3 mg/kg) of door hypofysectomie. Hypofysectomie werd verricht via parapharyngeale weg of via het oor met een Hoffman-Reiter hypofysectomie-instrument.

#### 5.2.3. Histologische methode, microscopie en fotografie.

Histologisch materiaal werd in Bouin gefixeerd. Na 24 uur werd de Bouin-oplossing vervangen door een oplossing bestaande uit 70% alcohol en 30% water. Met behulp van een histokinette vond inbedding in paraplast plaats. De ovaria

werden in serie in coupes van  $10\mu$  gesneden en gekleurd met eosine-hematoxyline. De coupes werden met een microscoop bestudeerd.

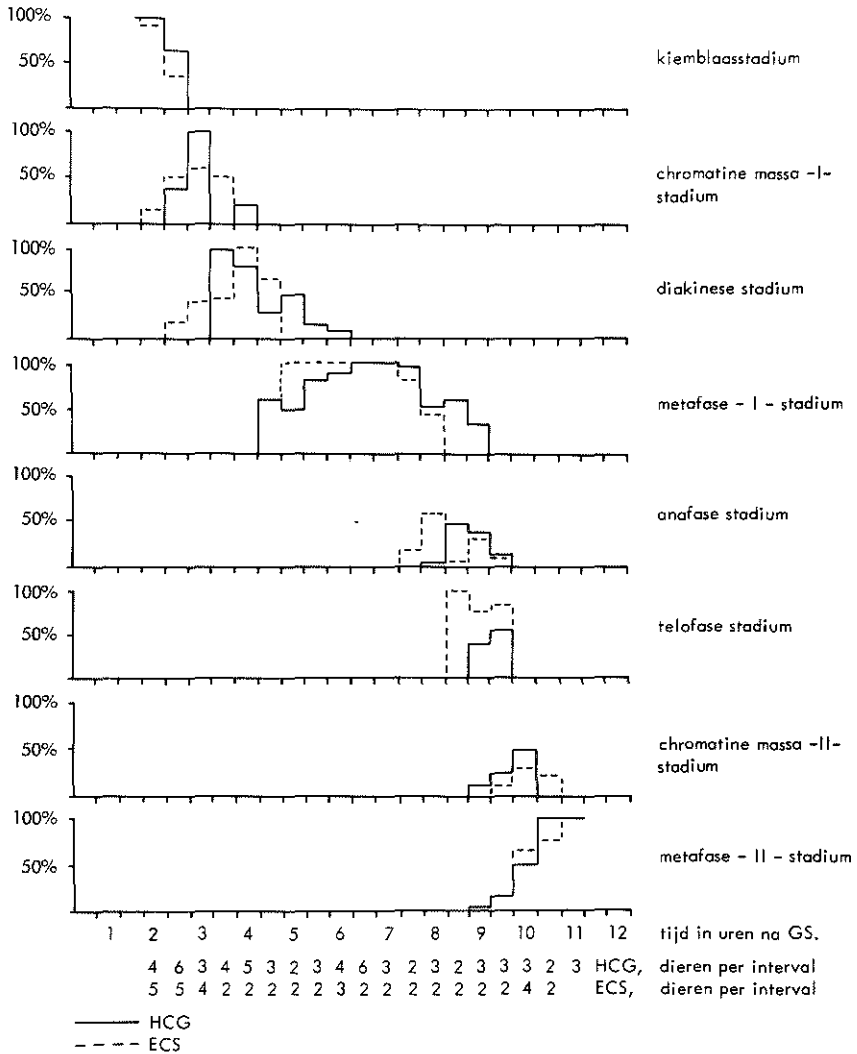
### 5.3. Resultaten.

#### 5.3.1. Het verloop van het tijdschema van de eerste rijpingsdeling na inductie met verschillende ovulatoire gonadotrope stimuli.

Op de dag van pro-oestrus werden tussen 11.00 en 13.00 uur 53 ratten elektrochemisch gestimuleerd (5.2.2.2) in het pre-optische gebied. Eenzijdige ovariectomie werd met intervallen van 30 minuten tussen 2 en 11 uur na stimulatie verricht om het tijdschema van de rijpingsdeling te bestuderen. Het andere ovarium bleef in het dier om de volgende morgen controle op ovulatie mogelijk te maken. Slechts die dieren die geovuleerd hadden werden verder bestudeerd (47 stuks). Een andere groep van 64 ratten werd tussen 11.00 en 13.00 uur tijdens pro-oestrus met 10 IU HCG intraperitoneaal geïnjectieerd. Deze dosis is voldoende voor de inductie van ovulatie. Ovariectomie werd met intervallen van 30 minuten tussen 2 en 11 uur na HCG-injectie verricht om het verloop van het tijdschema van de eerste rijpingsdeling te bestuderen. (De oöcyten van beide diergroepen werden gebruikt om de morfologie van de onderscheiden stadia van de eerste rijpingsdeling te beschrijven (zie hoofdstuk 4)).

Om de spontane afgifte van endogene gonadotrope hormonen te voorkomen werden zowel de elektrochemisch gestimuleerde als de met HCG behandelde dieren tussen 13.15 en 13.45 uur met Nembutal geïnjectieerd.

De resultaten van de analyse van de verschillende



figuur 5-1. Tijdschema van de eerste rijpingsdeling na inductie met humaan choriongonadotropine (HCG, 10 IU ip) of elektrochemische stimulatie (ECS,  $3 \times 10$  sec  $160 \mu\text{A}$  DC). GS = gonadotrope stimulatie.

Het percentage per interval van 0,5 h in figuur 5-1 en in figuur 5-2 is het gemiddelde van de percentages van de oöcyten in het betreffende stadium van de rijpingsdeling van individuele dieren.



stadia van de eerste rijpingsdeling zijn weergegeven in figuur 5-1. Elk onderscheiden stadium blijkt een eigen plaats op de tijdschaal te hebben. Uit figuur 5-1 blijkt dat het tijdschema van de onderscheiden stadia van de rijpingsdeling van de met HCG behandelde en de elektrochemisch gestimuleerde dieren gelijk is. Het interval tussen het tijdstip waarop 50% van de kernen verdwenen was en het tijdstip waarop 50% van de oöcyten in metafase II gekomen was bedroeg bij beide groepen 7,5 uur.

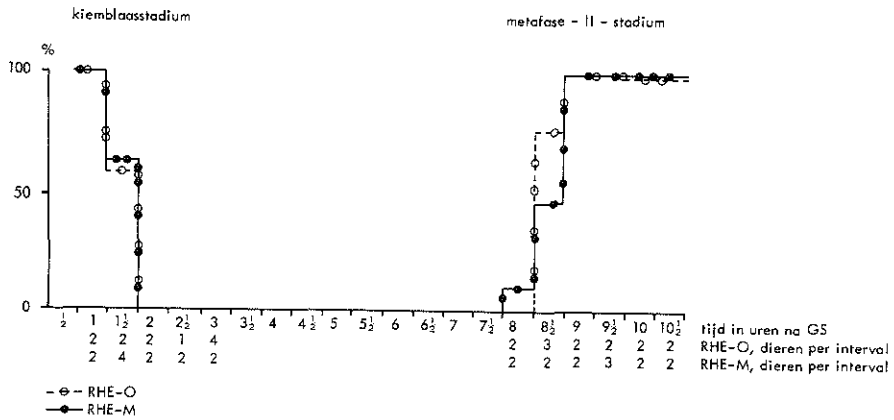
### 5.3.2. Het verloop van de eerste rijpingsdeling na inductie op twee verschillende tijdstippen van de dag van pro-oestrus.

Twee groepen ratten die in pro-oestrus waren, werden intraperitoneaal geïnjectieerd met een ovulatoire dosis ratte-hypofyse-extract (2 RHE). De eerste groep (24 ratten) werd 's morgens om 5.00 uur en de tweede groep (25 ratten) werd tussen 11.00 - 13.00 uur behandeld. De groepen werden op deze twee verschillende tijdstippen behandeld om na te kunnen gaan of het verloop van de eerste rijpingsdeling afhankelijk is van het tijdstip waarop gonadotrope stimulatie plaatsvindt.

Nembutal (33,3 mg/kg) werd in beide groepen proefdieren 45 minuten na de injectie met hypofyse-extract intraperitoneaal ingespoten om een vergelijking met ECS- en HCG-groepen mogelijk te maken.

De resultaten zijn weergegeven in figuur 5-2. De tijdschema's van de rijpingsdeling van de beide proefdiergroepen waren niet verschillend. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het tijdschema volledig afhankelijk is van het moment waarop de injectie met hypofyse-extract heeft plaatsgevonden. Het interval tussen het tijdstip van injectie met hypofyse-extract en het moment waarop 50% van de kernen verdwenen was bedroeg 1,5 uur. Het interval tussen het moment

waarop 50% van de kernen verdwenen was en het tijdstip waarop 50% van de oöcyten zich in metafase II bevonden bedroeg 7 uur.



figuur 5-2. Aanvang (verdwijnen van het kernmembran) en einde (verschijnen van de metafase-II-kernspoel) van de eerste rijpsdeling na inductie met rattehypofyse-extract (2 RHE ip) te 5.00 h (RHE-O groep) of tussen 11.00-13.00 h (RHE-M groep).  
RHE = rattehypofyse-extract, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse, O = ochtend, M = middag,  
GS = gonadotrope stimulatie.

### 5.3.3. Het effect van een subovulatoire dosis gonadotrope hormonen op de rijpsdeling.

Zestien ratten werden tussen 11.00 en 12.00 uur op de dag van pro-oestrus elektrochemisch gestimuleerd, waarna zij 30, 40 of 60 minuten later gehypofysectomeerd werden. Dit werd gedaan om na te gaan of een beperkte hoeveelheid gonadotrope hormonen effect heeft op het tijdschema van de eerste rijpsdeling en of het mogelijk was oöcyt-rijping te induceren zonder aansluitende ovulatie. Per dier werd één ovarium 3 tot 5 uur na elektrochemische stimulatie verwijderd om de rijpsdeling van pre-ovulatoire oöcyten te bestuderen. Het andere ovarium bleef tot de volgende dag in het dier om ovulatie-controle mogelijk te maken en om te zien of er niet-geovuleerde,

niet-volledig gerijpte oöcyten aanwezig waren.

Het effect van intervalvariatie tussen elektrochemische stimulatie en het tijdstip van hypofysectomie op de ovulatierepons is weergegeven in tabel 5-1. Uit deze tabel blijkt dat 60 minuten voldoende was voor de inductie van ovulatie.

tabel 5-1. Ovulatierepons van cyclische ratten die 30, 45 en 60 minuten na ECS gehypofysectomeerd werden. ECS vond tussen 11.00 en 13.00 uur plaats op pro-oestrus.

ovulatierepons oöcyten/dier	interval ECS - hypofysectomie		
	30 min	45 min	60 min
0	3/3	5/9	-
1	-	3/9	1/4
>1	-	1/9	3/4

ECS= elektrochemische stimulatie.

Alle in de pre-ovulatoire follikels achtergebleven oöcyten van ovaria waarvan slechts één follikel gesprongen was waren volledig gerijpt (4 ovaria van 4 ratten). In de andere ovaria van deze dieren, die 3 - 5 uur na elektrochemische stimulatie verwijderd waren, bleken 21 van de 22 pre-ovulatoire oöcyten zich in dezelfde stadia van de rijpingsdeling te bevinden als de oöcyten van ovaria die eveneens 3-5 uur na elektrochemische stimulatie gefixeerd waren en waarbij de afgegeven dosis gonadotrope hormonen ovulatoir was (figuur 5-1, ECS groep).

De ovaria van 8 ratten bleken op de dag na de elektrochemische stimulatie geen gesprongen follikels te bevatten. Het interval (30 of 45 minuten) tussen elektrochemische stimulatie en hypofysectomie was blijkbaar onvoldoende geweest voor de afgifte van een ovulatoire dosis

gonadotrope hormonen. De resultaten van het microscopisch onderzoek van de ovaria die 3 - 5 uur of 24 uur na de behandeling gefixeerd zijn, is weergegeven in tabel 5-2.

tabel 5-2. Analyse van de stadia van de ERD van oöcyten van ovaria die 3-5 uur en 24 uur na ECS verwijderd zijn uit ratten die 30-45 minuten na ECS gehypofysectomeerd waren en die niet ovuleerden. ECS vond tussen 11.00 en 13.00 uur plaats op pro-oestrus.

interval	ECS-hypofysectomie	ECS-1ste ovariëctomie	stadia ERD 1ste ovarium	stadia ERD 2de ovarium
30 min		3 h	4/4 KB	5/ 5 KB
30 min		3,5h	8/8 KB	4/ 4 KB
30 min		4 h	5/7 KB 1/7 CMI 1/7 D	4/ 6 KB 2/ 6 MFII
45 min		3,5h	3/4 KB 1/4 CMI	6/10 KB 4/10 MFII
45 min		4 h		8/8 D 4/ 4 MFII
45 min		5 h	7/7 KB	5/ 5 KB
45 min		5 h		6/6 D 7/ 7 MFII
45 min		5 h	2/4 KB 1/4 CMI 1/4 D	1/ 6 KB 5/ 6 MFII

ERD= eerste rijpingsdeling, ECS= elektrochemische stimulatie, KB= kiemblaas, CMI= chromatinemassa I, D= diakinese, MFII= metafase II.

Het bleek dat de pre-ovulatoire oöcyten van de ovaria die één dag na de behandeling gefixeerd waren of volledig gerijpt of nog in het kiemblaas-stadium waren (tabel 5.2, laatste kolom). Tussenliggende stadia werden niet waargenomen. Het aantal oöcyten dat 3 tot 5 uur na de elektrochemische behandeling met de rijpingsdeling begonnen was, is gelijk aan het aantal oöcyten dat op de dag na de behandeling gerijpt was. Hieruit kan geconcludeerd worden dat indien oöcytrijping niet 3 tot 5 uur na gonadotrope stimulatie begonnen is, de oöcyt in het kiemblaas-stadium zal blijven.

Uit het feit dat volledig gerijpte oöcyten aanwezig waren in niet-gesprongen follikels kan geconcludeerd worden dat de drempelwaarde voor de inductie van oöcytrijping lager is dan die voor follikelsprong.

#### 5.4. Discussie.

Thibault (1972, 1973) vergeleek de morfologie van de konijne-oöcyt, nadat rijping *in vivo* of *in vitro* plaatsgevonden had. Het bleek dat de *in vivo* gerijpte oöcyten een tangentieel, op het oölemma, gehechte kernspoel hadden. Het merendeel van de *in vitro* gerijpte oöcyten had een

radiair gerangschikte, nauwelijks aan het oölemma gehechte kernspoel. De omstandigheden waaronder de oöcyt zich bevindt heeft blijkbaar invloed op de wijze waarop de rijpingsdeling voltooid wordt.

Bij onze experimenten konden bij vergelijking van de details van de verschillende stadia van de rijpingsdeling na het toedienen van HCG en na elektrochemische stimulatie geen verschillen ontdekt worden. Ook in die gevallen waar de dosis gonadotrope hormonen slechts voldoende was om enkele oöcyten per dier te doen rijpen kwamen de waargenomen stadia volledig overeen met die waarin de dosis gonadotrope hormonen ruim voldoende was om alle oöcyten te laten rijpen en de follikels te laten springen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de rijpingsdeling *in vivo* onafhankelijk van de manier waarop de inductie heeft plaatsgevonden volgens een vaststaand patroon verloopt.

Indien het tijdschema van de rijpingsdeling niet volgens een vast patroon zou verlopen, dan zouden de in figuur 5-1 weergegeven tijden waarin de onderscheiden stadia doorlopen werden, elkaar overlappen. Dit is echter niet het geval. De stadia hebben een vaste tijdsrelatie tot elkaar en eveneens tot het tijdstip waarop inductie van oöcytrijping heeft plaatsgevonden. Op grond hiervan kan geconcludeerd worden dat wanneer er een ovulatoire gonadotrope stimulatie plaatsgevonden heeft, de rijpingsdeling volgens een vast tijdschema verloopt.

Uit figuur 5-2 blijkt dat het verloop van de oöcytrijping afhankelijk is van het moment waarop gonadotrope stimulatie plaatsvindt en onafhankelijk is van de tijd van de dag van pro-oestrus. De follikelsprong daarentegen blijkt wellicht gedurende een beperkte periode van de nacht plaats te vinden. Deze periode is onafhankelijk van het tijdstip, 5.00 of 11.00 uur, waarop de afgifte van gonadotrope hormonen geïnduceerd is (Holsinger en Everett 1972).

Het interval tussen het moment van behandeling en het tijdstip waarop 50% van de oöcyten met de rijpingsdeling begonnen is, bedraagt bij de elektrochemisch gestimuleerde

groep ongeveer 2,5 uur (figuur 5-1) en bij de met hypofyse-extract behandelde groep ongeveer 1,5 uur (figuur 5-2). Het verschil is ongeveer 1 uur. Dit verschil wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de tijd die na elektrochemische stimulatie nodig is voor de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen. Dit komt overeen met bepalingen van luteïniserend hormoon (Clemens et al 1971, Kalra et al 1971, Turgeon en Barraclough 1973) en gegevens over de effecten van hypofysectomie na ECS (Everett 1964).

Het interval tussen het verdwijnen van de kern en het verschijnen van het metafase-II-stadium is in alle groepen 7 tot 7,5 uur (figuren 5-1, 5-2). Dit komt overeen met waarnemingen van Mandl (1963) (ongeveer 7 uur). Volgens Tsafiriri en Kraicer (1972) was dat interval 5 uur. De in dit hoofdstuk gepresenteerde waarnemingen zijn afkomstig van dieren waarvan voor elk dier afzonderlijk het moment van gonadotrope stimulatie bekend was. Hierin verschillen deze waarnemingen in een belangrijk opzicht met die van Mandl, Tsafiriri en Kraicer. In de HCG-proefdiergroep was 50% van de kernen 2,5 uur na de HCG-injectie verdwenen (figuur 5-1). Bij de met ratte-hypofyse-extract behandelde dieren was dit interval 1,5 uur (figuur 5-2). Bij beide groepen was het interval tussen verdwijnen van de kern en het verschijnen van de metafase-II-kernspoel 7 - 7,5 uur. In tegenstelling tot Tsafiriri en Kraicer, die concludeerden dat het tijdstip waarop de kern verdwijnt niet in relatie staat met latere stadia van oöcytrijping, kan uit deze gegevens geconcludeerd worden dat na het verdwijnen van de kern de rijpingsdeling volgens een vaststaand tijdschema verloopt.

De met HCG- en met hypofyse-extract behandelde dieren werden intraperitoneaal geïnjectieerd. Voor beide groepen kan het moment van injectie gelijkgesteld worden met het moment van gonadotrope stimulatie. Toch bestaat er een verschil van 1 uur tussen het moment van injectie en het tijdstip waarop bij 50% van de oöcyten de kern verdwenen

was. De doses HCG en hypofyse-extract waren beide ruim voldoende om ovulatie te induceren (6.3.2 en 6.3.3). Oöcyten die uit antrale follikels geïsoleerd worden kunnen in een hormoon-vrij medium de rijpingsdeling hervatten en en voltoeien. De gonadotrope hormonen hebben waarschijnlijk geen rechtstreekse invloed op de oöcyt, maar veranderen het milieu waarin de oöcyt verkeert zodanig dat rijping mogelijk wordt (Pincus en Enzmann 1935, Biggers 1972, Zeilmaker et al 1972). Bij *in vitro* incubatie van ratte-oöcyten is het kleinste interval waarbinnen de kern verdwijnt ongeveer 1,5 uur (Zeilmaker, persoonlijke mededeling). Dit is gelijk aan het interval dat gevonden werd in de met hypofyse-extract behandelde dieren. Blijkbaar is dit de kortste tijd die tussen inductie van de rijpingsdeling en verdwijnen van de kern mogelijk is. Bovengenoemd verschil van een uur werd door Thibault (1972,1973) eveneens waargenomen bij het konijn. De kernmembraan van de oöcyt van dit dier verdwijnt tijdens *in vitro* incubatie ongeveer een uur eerder dan *in vivo* na HCG-injectie.

## Hoofdstuk 6. Oöcytrijping, luteïnisatie en ovulatie.<sup>1)</sup>

### 6.1. Inleiding.

In een normale ovariële cyclus hangen oöcytrijping, follikelsprong en corpus luteum-vorming nauw met elkaar samen. Oöcytrijping gaat aan de follikelsprong vooraf en de gesprongen follikel differentieert zich tot corpus luteum. Oöcytrijping, follikelsprong en corpus luteum-vorming (luteïnisatie) worden alle gelijktijdig door gonadotrope hormonen geïnduceerd. Follikelsprong is een kenmerk voor een ovulatoire stimulus. De aanwezigheid van corpora lutea is eveneens een kenmerk voor het optreden van een ovulatoire gonadotrope stimulus. Oöcytrijping wordt tot nu toe echter niet gebruikt als kenmerk van gonadotrope stimulatie. Een mogelijke oorzaak hiervan zou kunnen zijn dat oöcytrijping in atretische follikels plaatsvindt zonder dat gonadotrope hormonen hiervoor nodig zijn.

In dit hoofdstuk wordt de bruikbaarheid van oöcytrijping als index voor gonadotrope stimulatie besproken en deze bruikbaarheid wordt vergeleken met die van follikelsprong en corpus luteum-vorming.

### 6.2. Materiaal en methode.

De proefdieren waren cyclische of neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten die op een leeftijd van 3 tot 6 maanden met een kleine dosis HCG (0,2 - 0,5 IU) of hypofyse-extract (1/32 - 1/1 RHE) intraveneus geïnjectieerd

<sup>1)</sup> Dit hoofdstuk is gepubliceerd in *Endocrinology* (Vermeiden en Zeilmaker 1974).



werden. De cyclische dieren werden vlak voor de gonadotrope behandeling gehypofysectomeerd om spontane afgifte van endogene gonadotrope hormonen te voorkomen. Hypofysectomie en intraveneuze injectie werden onder tribromo-ethanol (Avertine) narcose uitgevoerd. Bij neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten vindt er geen spontane afgifte van ovulatoire gonadotrope hormonen plaats. Het werd daarom niet nodig geacht deze dieren te hypofysectomereren. (Voor een toelichting waarom deze dieren gebruikt werden zie 6.3.4.)

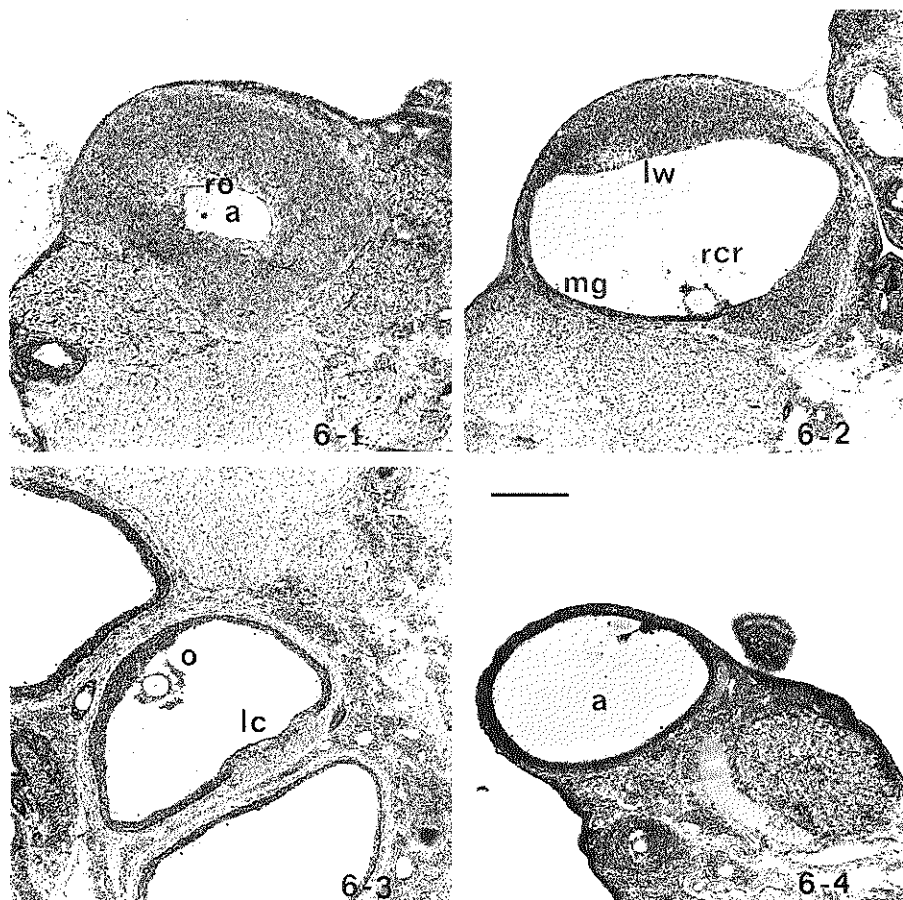
Tenzij anders gesteld werd per dier op de eerste dag na de behandeling met gonadotrope hormonen controle op ovulatie uitgevoerd en werd per dier een ovarium gefixeerd om vast te kunnen stellen of oöcytrijping had plaatsgevonden. Het andere ovarium werd twee dagen na de behandeling met gonadotrope hormonen gefixeerd om het optreden van luteïnisatie te kunnen bestuderen.

De details zijn bij de beschrijving van de experimenten vermeld.

### 6.3. Resultaten.

#### 6.3.1. Luteïnisatie.

Bij de microscopische bestudering van de ovaria, die op de tweede dag na de behandeling met gonadotrope hormonen gefixeerd waren, bleek dat luteïnisatie geen alles of niets verschijnsel was. Er waren allerlei overgangsvormen tussen niet-geluteïniseerde en volledig geluteïniseerde follikels. Om deze reden werd er een klassificatie gemaakt, die weergeeft in welke mate een follikel geluteïniseerd is. De onderscheiden klassen geven bij benadering aan hoeveel granulosa-cellen er per follikel groter en meer acidofiel zijn en een blazige kern gekregen hebben: de kenmerken



figuren 6-1 t/m 6-4. Vier stadia van luteïnisatie. De foto's zijn van dezelfde vergroting, de zwarte staaf in figuur 6-4 geeft 250 $\mu$  weer. De foto's zijn gemaakt van ovaria van cyclische ratten die twee dagen na hypofysectomie en injectie met humaan choriongonadotropine of rattehypofyse-extract gefixeerd zijn.

figuur 6-1. Volledige luteïnisatie, ro= restant oöcyt, a= antrum. Het dier was met 1/16 RHE ingespoten (iv).

figuur 6-2. Gedeeltelijke luteïnisatie, lw= luteïne weefsel, mg= membra-na granulosa, rcr=restant corona radiata. Het dier was met 0,5 IU HCG ingespoten.

figuur 6-3. Geringe luteïnisatie, lc= luteïne cyste, o= kernhoudende, niet gerijpte oöcyt. Foto is van hetzelfde ovarium gemaakt als figuur 6-2.

figuur 6-4. Geen luteïnisatie. Membrana granulosa is atretisch geworden. Restant van corona radiata is in het antrum (a) zichtbaar. Het dier was met 1/32 RHE ingespoten (iv) waarop oöcytrijping maar geen luteïnisatie volgde.

van een luteïneceel (Pederson 1951). In de geluteïniseerde gedeelten van een follikel bleek de scheiding tussen membrana granulosa en theca interna verdwenen. Bloedvaten waren de geluteïniseerde gebieden van de membrana granulosa ingegroeid.

Er werden vier typen geluteïniseerde follikels onderscheiden:

1. Volledige luteïnisatie: alle, of vrijwel alle granulosa-cellen zijn tot luteïne-cellen gedifferentieerd. Een volledig geluteïniseerde follikel vertoont dezelfde histologische kenmerken als een corpus luteum van de normale cyclus. Indien een follikel niet gesprongen is dan bevat het corpus luteum vaak een groot antrum (figuur 6-1).
2. Onvolledige luteïnisatie: een duidelijk gedeelte van de membrana granulosa en de theca interna is niet tot luteïne-weefsel gedifferentieerd. Niet-geluteïniseerde granulosa-cellen zijn atretisch (figuur 6-2).
3. Geringe luteïnisatie: een groepje bij elkaar liggende luteïne-cellen zijn aanwezig in een overigens atretische follikel (figuur 6-3).
4. Geen luteïnisatie. Luteïne-cellen zijn in deze follikel afwezig. De granulosa-cellen zijn atretisch geworden (figuur 6-4).

#### 6.3.2. Oöcytrijping en luteïnisatie bij met HCG-behandelde cyclische ratten.

Drie en twintig ratten werden op de dag van pro-oestrus tussen 11.00 en 13.00 uur gehypofysectomeerd en vervolgens intraveneus geïnjicieerd met een dosis HCG die varieerde tussen 0,2 en 0,5 IU. De volgende morgen werd op ovulatie gecontroleerd en per dier werd een ovarium gefixeerd. De overgebleven ovaria werden twee of drie dagen na de HCG-behandeling gefixeerd.

tabel 6-1. Ovulatierepons van cyclische ratten die intraveneus met verschillende doses humaan choriongonadotropine zijn geïnjectieerd. Injectie vond plaats tussen 11.00 en 13.00 uur na hypofysectomie op pro-oestrus.

ovulatierepons oöcyten/dier	dosis HCG (IU)			
	0,2	0,3	0,4	0,5
0	4/4	2/5	6/7	3/7
1-6	-	1/5	1/7	3/7
>6	-	2/5	-	1/7

HCG= humaan choriongonadotropine.

De ovulatierepons van deze dieren is weergegeven in tabel 6-1. Bij vijftien van de drie en twintig dieren werden geen gesprongen follikels aangetroffen. Van deze vijftien dieren bleken er acht geen enkele gerijpte oöcyt te bevatten. Deze acht worden verder niet besproken. Van de overgebleven zeven ratten bleek bij één rat alle pre-ovulatoire follikels een gerijpte oöcyt te bevatten. De pre-ovulatoire follikels van de overige zes ratten bevatten of een gerijpte oöcyt of een oöcyt in het kiemblaas-stadium. De resultaten van het microscopisch onderzoek van deze zeven ratten zijn weergegeven in tabel 6-2. Uit deze tabel blijkt dat volledige luteïnisatie altijd gepaard gaat met oöcytrijping. In de onvolledig of gering geluteïniseerde follikels waren zowel gerijpte als niet-gerijpte oöcyten aanwezig.

tabel 6-2. Relatie tussen oöcytrijping en luteïnisatie in individuele follikels van ovaria van een groep van 7 gehypofysectomeerde ratten die met 0,2-0,5 IU humaan choriongonadotropine behandeld zijn.

graad van follikelluteïnisatie	aantal ratten (n=7)	aantal follikels (n=40)	aantal oöcyten in stadia ERD	
			KB	MF II
volledig	5	9	0	9
gedeeltelijk	6	12	5	7
gering	5	9	8	1
niet	5	10	9	1

ERD= eerste rijpingsdeling, KB= kiemblaas, MF II= metafase II.

### 6.3.3. Met hypofyse-extract behandelde cyclische ratten.

Dit experiment werd uitgevoerd zoals beschreven is in 6.3.2 met dien verstande, dat in plaats van HCG verschillende doses ratte-hypofyse-extract (1/32 - 1/2 RHE) geïnjectieerd werden. De proefgroep bestond uit 24 dieren. Van de dieren die met de laagste dosis (1/32 RHE) behandeld waren werd van drie dieren een ovarium één dag na de aanvang van het experiment verwijderd en gefixeerd. Dit om te constateren of deze dosis voldoende was om oöcytrijping te induceren. Bij microscopisch onderzoek bleken alle 21 pre-ovulatoire oöcyten de eerste rijpingsdeling voltooid te hebben. De dosis van 1/32 RHE was dus voldoende om oöcytrijping te induceren en aangenomen werd dat dit ook het geval was met de hogere doses. De ovaria van de dieren die met hogere doses behandeld waren werden daarom twee dagen na de gonadotrope behandeling gefixeerd. Deze werkwijze heeft als voordeel dat extra materiaal beschikbaar was om de luteïnisatie te bestuderen.

tabel 6-3. Ovulatierepons van cyclische ratten die intraveneus met verschillende doses rattehypofyse-extract zijn geïnjectieerd. Injectie vond plaats tussen 11.00 en 13.00 uur na hypofysectomie op pro-oestrus.

ovulatierepons oöcyten/dier	dosis hypofyse-extract (RHE)				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
0	-	-	2/6	2/4	6/6
1-6	-	1/4	3/6	2/4	-
>6	4/4	3/4	1/6	-	-

RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

De ovulatie-respons van de met verschillende doses hypofyse-extract geïnjectieerde groepen is weergegeven in tabel 6-3. In tabel 6-4 zijn de aantallen gerijpte oöcyten en geluteïniseerde follikels weergegeven. De doses van 1/8 en hoger induceerden rijping van alle oöcyten en volledige luteïnisatie van alle follikels. In de dieren die met 1/16 RHE behandeld waren bleken alle pre-ovulatoire oöcyten gerijpt te zijn en 45 van de 48 follikels waren geluteïniseerd (44 volledig, 1 gedeeltelijk). In slechts 3 van de

45 geluteïniseerde follikels had follikelsprong plaatsgevonden. De groep dieren die met 1/32 RHE behandeld was bestond uit 6 ratten. Van 3 dieren werd een ovarium één dag na de behandeling gefixeerd; de andere 9 ovaria na twee dagen. Deze 9 ovaria bevatten 52 pre-ovulatoire follikels waarvan er 9 geluteïniseerd waren (5 volledig, 3 gedeeltelijk en 1 gering). De oöcyten in deze 9 geluteïniseerde follikels waren gerijpt. De 43 niet-geluteïniseerde follikels waren atretisch geworden; 36 hiervan bevatten gerijpte oöcyten. Uit deze waarnemingen kan geconcludeerd worden dat

tabel 6-4. Oöcytrijping en luteïnisatie in ovaria van ratten twee dagen na hypofysectomie en injectie (iv) met hypofyse-extract op pro-oestrus.

dosis hypofyse-extract (RHE)	aantal dieren	aantal gerijpte oöcyten/ovarium	aantal geluteïniseerde <sup>1)</sup> follikels/ovarium
1/ 2	4	5,6	5,6
1/ 4	4	5,8	5,8
1/ 8	6	5,7	5,7
1/16	4	6,0	6,0
1/32	6	5,0	1,0

1) Volledig, gedeeltelijk en gering geluteïniseerde follikels.  
RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

na behandeling met ratte-hypofyse-extract oöcytrijping geïnduceerd kan worden zonder dat deze door luteïnisatie of follikelsprong gevolgd wordt. Geluteïniseerde follikels met niet gerijpte oöcyten werden niet waargenomen en alle gesprongen follikels waren geluteïniseerd. Luteïnisatie van een niet-gesprongen follikel kwam veelvuldig voor.

#### 6.3.4. Met hypofyse-extract behandelde neonataal met androgeen gesteriliseerde dieren.

Dit experiment werd met neonataal met androgeen gesteriliseerde dieren uitgevoerd om na te kunnen gaan of het verschil in effect van HCG en ratte-hypofyse-extract op oöcytrijping en luteïnisatie verklaard kon worden uit het feit dat hypofysaire gonadotrope hormonen een veel kleinere halfwaarde tijd hebben dan HCG (Parlow 1968).

Neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten ovulieren niet spontaan. Daarom werd het niet nodig geacht deze te hypofysectomeren. Verondersteld werd dat de aanwezigheid van een hypofyse tot gevolg had dat er een basaal niveau aan gonadotrope hormonen aanwezig zou zijn in de periode waarin luteïnisatie plaatsvindt. Indien dit zo is vertoont deze situatie meer gelijkenis met een gehypofysectomeerd, met HCG behandeld dier dan met een gehypofysectomeerd met hypofyse-extract behandeld cyclisch dier.

6.3.4.1. Tweeëndertig neonataal met androgeen gesteriliseerde dieren werden met verschillende doses rattehypofyse-extract (1/32 - 1/1 RHE) tussen 11.00 - 13.00 uur geïnjectieerd. De buikwand werd de volgende dag geopend om op ovulatie te controleren en om een ovarium te fixeren. Het contralaterale ovarium werd twee dagen na de injectie met rattehypofyse-extract gefixeerd om luteïnisatie te kunnen bestuderen.

tabel 6-5. Ovulatierepons van met androgeen neonataal gesteriliseerde ratten die intraveneus met verschillende doses rattehypofyse-extract zijn geïnjectieerd.

ovulatierepons oöcyten/dier	dosis hypofyse-extract (RHE)					
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
0	-	-	2/6	2/4	6/7	6/6
1-6	-	1/5	3/6	2/4	1/7	-
>6	5/5	4/5	1/6	-	-	-

RHE= rattehypofyse-eenheid, 1RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

De ovulatierepons na behandeling met verschillende doses rattehypofyse-extract is weergegeven in tabel 6-5. Het optreden van oöcytrijping en follikelluteïnisatie van deze dieren is weergegeven in tabel 6-6. Uit tabel 6-6 blijkt dat oöcytrijping is waargenomen in de groep die

met 1/32 RHE behandeld werd. In de groep die met 1/16 RHE behandeld was werden oöcytrijping en een paar geluteïniseerde follikels waargenomen. Uit de tabellen 6-5 en 6-6 is te concluderen dat bij neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten oplopende hoeveelheden hypofyse-extract nodig zijn voor de inductie van oöcytrijping, follikel-luteïnisatie en follikelsprong. De neonataal met androgeen gesteriliseerde dieren reageerden wat dit betreft op dezelfde wijze als de cyclische dieren die na hypofysectomie met hypofyse-extract behandeld waren.

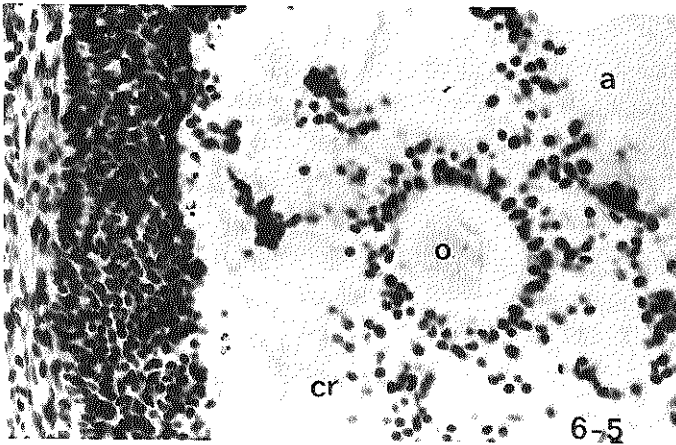
tabel 6-6. Oöcytrijping en luteïnisatie in ovaria van met androgeen neonataal gesteriliseerde ratten na injectie met rattehypofyse-extract. Oöcytrijping werd bestudeerd in ovaria die één dag en luteïnisatie werd bestudeerd in ovaria die twee dagen na injectie gefixeerd waren.

dosis hypofyse-extract (RHE)	aantal dieren	aantal gerijpte oöcyten/ovarium	aantal geluteïniseerde follikels/ovarium
1/ 8	4	5,0	7,0
1/16	7	4,7	1,1
1/32	6	1,8	0

1) Volledig, gedeeltelijk en gering geluteïniseerde follikels.  
RHE= rattehypofyse-extract, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

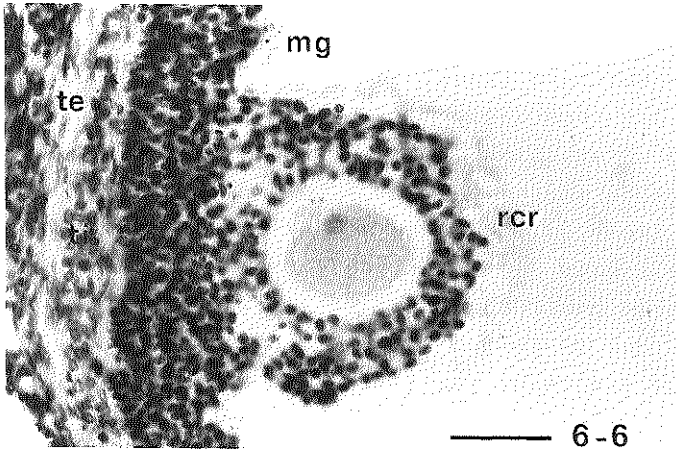
6.3.4.2. In de ovaria van neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten vindt ontwikkeling tot pre-ovulatoire follikels plaats. Een injectie met een dosis gonadotrope hormonen welke bij cyclische pro-oestrus ratten ovulatoir is, heeft bij met androgeen neonataal gesteriliseerde ratten altijd follikelsprong tot gevolg (Uilenbroek 1974). De ovulatoire gonadotrope stimulatie vindt echter niet spontaan plaats. Door het achterwege blijven van een ovulatoire gonadotrope stimulus worden pre-ovulatoire follikels na enkele dagen atretisch (Everett en Sawyer 1950).



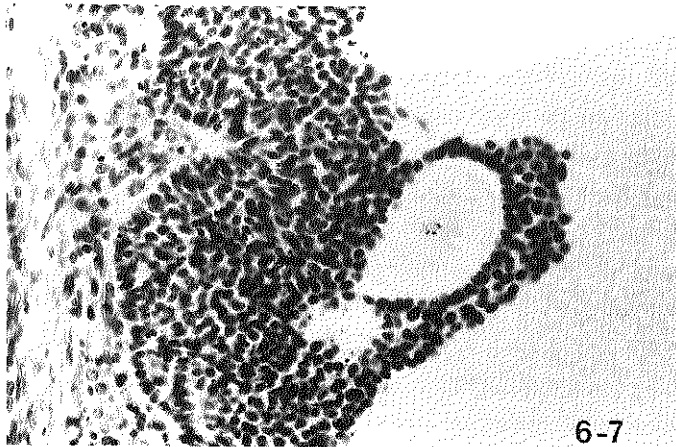


Figuren 6-5, 6-6 en 6-7 zijn foto's van coupe's van ovaria van neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten. De staaf in figuur 6-6 geeft 50 $\mu$  weer.

figuur 6-5. Eén dag na injectie met 1/16 RHE (ratte-hypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse). De oöcyt (o) is gerijpt en wordt omgeven door een corona radiata (cr). De oöcyt bevindt zich vrijzwevend in het antrum.



figuur 6-6. Twee dagen na injectie met 1/16 RHE. De oöcyt bevindt zich tegen de membrana granulosa (mg) en wordt omgeven door de restanten van de corona radiata (rcr). te= theca externa, ti= theca interna.



figuur 6-7. Oöcytrijping door follikel-atresie. Er wordt geen corona radiata gevormd. Dit dier werd niet met hypofyse-extract ingespoten.

Bij de rat vindt oöcytrijping plaats in atretische follikels zonder dat gonadotrope hormonen nodig zijn (pseudomaturatie) (Ingram 1962, Young 1961). Er moest bij de bestudering van de ovaria van neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten een onderscheid gemaakt worden tussen follikels waar oöcytrijping door de gonadotrope behandeling of door atresie veroorzaakt was. In de ovaria die een dag na de gonadotrope behandeling gefixeerd zijn leverde dit geen moeilijkheden op. De gerijpte oöcyt bevond zich omgeven door een corona radiata vrijzwevend in het antrum van een follikel. De oöcyt, waarvan de rijping een gevolg is van follikelatresie, wordt niet omgeven door een corona radiata maar blijft liggen in de restanten van de membrana granulosa.

De ovaria, die twee dagen na de gonadotrope behandeling gefixeerd waren, bleken, indien de gonadotrope stimulus onvoldoende was geweest om luteïnisatie te induceren, atretische follikels te bevatten. Het onderscheid tussen follikels die atretisch door veroudering of die atretisch waren geworden na gonadotrope behandeling was mogelijk doordat de restanten van de corona radiata nog in het antrum zichtbaar waren (figuren 6-5, 6-6, 6-7).

6.3.4.3. Een zeer opvallend verschijnsel was dat follikels waar de gonadotrope stimulatie voldoende was geweest voor de inductie van oöcytrijping, maar onvoldoende voor de inductie van follikelluteïnisatie op de tweede dag na de gonadotrope behandeling sterk atretisch waren. Deze atresie was volkomen vergelijkbaar met die van follikels in ovaria van de gehypofysectomeerde dieren. Aanvankelijk werd verondersteld dat bij cyclische dieren deze follikelatresie het gevolg was van hypofysectomie. De met androgeen neonataal gesteriliseerde ratten hadden hun hypofyse nog, de afwezigheid van een hypofyse kon bij deze dieren

daarom niet de oorzaak van follikelatresie zijn. Een verklaring zou kunnen zijn dat de atresie van pre-ovulatoire follikels het gevolg was van een gonadotrope stimulus die wel voldoende was voor inductie van oöcytrijping maar niet voldoende voor de inductie van follikelluteïnisatie.

#### 6.4. Discussie.

Bij de interpretatie van de experimentele gegevens werd er van uitgegaan dat de effecten van het ruwe hypofyse-extract op de ovaria veroorzaakt werden door de gonadotrope hormonen die het extract bevatte (zie par. 5.2).

In de met HCG behandelde groep was geringe en gedeeltelijke luteïnisatie waargenomen in follikels waarvan de oöcyt nog in het kiemblaas-stadium verkeerde. Telkens ging oöcytrijping echter vooraf aan volledige follikelluteïnisatie. In de met hypofyse-extract behandelde groepen was steeds iedere vorm van luteïnisatie door oöcytrijping voorafgegaan. In de met hypofyse-extract behandelde groepen werd oöcytrijping welke niet gevolgd was door follikelluteïnisatie veelvuldig waargenomen. In alle proefgroepen werd de follikelsprong altijd gevolgd door differentiatie van de gesprongen follikel tot corpus luteum. Corpus luteum-vorming en oöcytrijping kunnen plaatsvinden zonder follikelsprong.

In feite is alleen een gesprongen follikel een aanwijzing voor de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen. Wanneer de spontane pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen met Nembutal geblokkeerd is of wanneer deze spontane afgifte niet plaats kan vinden zoals dit het geval is bij neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten, treden oöcytrijping en luteïnisatie van granulosa-cellen in pre-ovulatoire follikels niet op. Oöcytrijping en luteïnisatie van granulosa-cellen kunnen daarom beide opgevat worden als kenmerk van een "ovulatoire" gonadotrope stimulus.

De drempelwaarde voor de inductie van oöcytrijping door hypofyse-extract is, in vergelijking met die van follikelsprong en luteïnisatie, het laagst. Op grond hiervan kan geconcludeerd worden dat oöcytrijping de meest gevoelige index is voor een "ovulatoire" gonadotrope stimulus.

Follikelsprong kan tussen 12 en 36 uur na ovulatie-inductie worden geconstateerd. Vanaf 12 uur, omdat dit bij de rat het kleinste interval is tussen het moment van ovulatie-inductie en het plaatsvinden van de follikelsprong. Vanaf ongeveer 36 uur na inductie is het moeilijk om het optreden van follikelsprong vast te stellen omdat de vrijgekomen oöcyten dan degenereren. De aanwezigheid van corpora lutea is ongeveer 1,5 dag tot vele dagen na de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen een bruikbaar kenmerk voor deze afgifte. De aanwezigheid van oöcyten in de tubae of die van corpora lutea in de ovaria zijn algemeen geaccepteerde kenmerken van de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen. Wanneer deze afgifte heeft plaatsgevonden is niet op het uur of de halve dag nauwkeurig te zeggen (Holsinger en Everett 1972). Voor het vaststellen van het tijdstip van de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen is de rijpingsdeling te gebruiken. Van 1,5 tot 9 uur na aanvang van deze afgifte kan met behulp van de rijpingsdeling het tijdstip waarop deze afgifte aangevangen is vrij nauwkeurig bepaald worden (hoofdstuk 5). Indien in een rat ovariectomie met een interval van 9 uur wordt uitgevoerd dan is er een periode van 18 uur, waarin het tijdstip van de afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen kan worden vastgesteld. De rijpingsdeling is dus een zeer bruikbare index voor de afgifte van gonadotrope hormonen. Tussen 1,5 - 9 uur na deze afgifte is de bruikbaarheid van de rijpingsdeling optimaal.

De resultaten van de behandeling met ratte-hypofyse-extract van beide proefdiergroepen zijn weergegeven in de tabellen 6-4 t/m 6-6. Uit deze tabellen blijkt dat de

drempelwaarden voor de inductie van oöcytrijping, follikel-luteïnisatie en follikelsprong hoger is bij de neonataal met androgeen gesteriliseerde dieren dan bij de cyclische dieren. Bij beide groepen echter was de drempelwaarde voor de inductie van oöcytrijping het laagst, gevolgd door die van follikelluteïnisatie en vervolgens die van follikelsprong. Een andere overeenkomst tussen de resultaten van beide proefdiergroepen is dat de pre-ovulatoire follikels atretisch geworden waren in die gevallen waarbij de gonadotrope stimulatie onvoldoende was voor de inductie van follikelluteïnisatie. De pre-ovulatoire follikels van hypofyseloze cyclische ratten en die van de neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten, welke hun hypofyse nog bezaten, reageerden op vergelijkbare wijze na blootstelling aan ratte-hypofyse-extract. De aanwezigheid van een hypofyse speelde blijkbaar geen rol. De halfwaardetijd van hypofysaire gonadotrope hormonen is kort (Parlow 1968). Dit kan betekenen dat direct na de injectie slechts een kortstondige stimulatie van de pre-ovulatoire follikels plaatsvindt. Afhankelijk van de intensiteit van deze stimulatie vindt inductie van oöcytrijping, luteïnisatie of follikelsprong plaats. Blijkbaar behoeven deze processen nadat ze eenmaal geïnduceerd zijn geen gonadotrope stimulatie meer.

Pre-ovulatoire follikels werden bij neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten atretisch nadat zij blootgesteld waren aan een hoeveelheid gonadotrope hormonen, die onvoldoende was voor de inductie van follikel-luteïnisatie. Door de mogelijke implicaties hiervan, bijvoorbeeld dat follikelatresie tijdens de cyclus veroorzaakt wordt door een gonadotrope stimulus die juist onder de voor follikelontwikkeling vereiste drempelwaarde ligt, is besloten deze problematiek in een apart hoofdstuk te bespreken (hoofdstuk 7).

Na HCG-behandeling bleek geringe of gedeeltelijke luteïnisatie mogelijk in follikels waarvan de oöcyt niet

gerijpt was (par. 6.3.2). In met hypofyse-extract behandelde ratten werd luteïnisatie, hoe gering ook, steeds door oöcytrijping voorafgegaan. Baker (persoonlijke mededeling) nam in weefselcultures van muize-ovaria waar dat FSH (NIH-FSH-S<sub>1</sub>) op gewichtsbasis 10x potenter was bij de inductie van oöcytrijping dan LH (NIH-LH-S<sub>1</sub>). Het ruwe hypofyse-extract bevatte 20x meer FSH dan LH (hoofdstuk 3). Dus dit hypofyse-extract zou door het hoge FSH-gehalte een primair effect op de inductie van oöcytrijping kunnen hebben. Het interval tussen tijdstip van injectie en verdwijning van de kern van de oöcyt was in de hypofyse-extract behandelde groep 1,5 uur (figuur 5-2). Bij de met HCG behandelde dieren was dit interval 2,5 uur (figuur 5-1). Op grond van dit verschil van een uur en op grond van het feit dat na HCG-behandeling luteïnisatie zonder oöcytrijping mogelijk was kan geconcludeerd worden dat HCG op een andere wijze de rijpingsdeling induceert dan hypofyse-extract. HCG heeft een relatief sterke LH-werking en zwakke FSH-werking (Cole 1969). De gevonden verschillen tussen de met HCG en met hypofyse-extract behandelde proefdiergroepen kunnen wellicht teruggebracht worden tot verschillen in LH- en FSH-activiteiten tussen beide gonadotrope preparaten.

## Hoofdstuk 7. Atresie van pre-ovulatoire follikels.

### 7.1. Inleiding.

Het ovarium van een volwassen vrouwelijke rat bevat follikels in verschillende stadia van ontwikkeling. De generatie grootste follikels wordt pre-ovulatoir genoemd. In deze generatie kan na de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen oöcytrijping, luteïnisatie en follikelsprong plaatsvinden. Het aantal follikels dat met de ontwikkeling begint is vele malen groter dan het aantal follikels dat het pre-ovulatoire stadium bereikt (Mandl en Zuckerman 1952, Pederson 1972, Welschen 1972). Een follikel heeft blijkbaar een zeer grote kans tijdens dit ontwikkelingsproces uit te vallen.

Een uitgevallen follikel wordt atretisch. Een atretische follikel is herkenbaar aan de afwezigheid van delende granulosa-cellen en de aanwezigheid van pigmentkorreltjes in het antrum en de membrana granulosa. Deze pigmentkorreltjes worden gevormd door samengeklonterd chromatine van de kernen van de granulosa-cellen. Deze kernen worden pycnotisch (Ingram 1962). In een atretische follikel wordt oöcytrijping hervat zonder dat gonadotrope stimulatie plaatsvindt (Ingram 1962). De vorming van een corona radiata blijft echter achterwege. Ter onderscheid met de pre-ovulatoire oöcytrijping wordt dit wel pseudomaturatie genoemd. Oöcytrijping is in zulke gevallen een teken van gevorderde atresie.

Een follikel die eenmaal met de ontwikkeling begonnen is wordt of pre-ovulatoir of atretisch (Pederson 1972, zie ook 2.5). Eenmaal in het pre-ovulatoire stadium kan een follikel onder invloed van een gonadotrope stimulus zich differentiëren tot corpus luteum en op deze wijze ontkomen aan atresie. Blijft zulk een stimulus achterwege dan worden

ook pre-ovulatoire follikels atretisch. Dit kan het geval zijn bij dieren waar de afgifte van ovulatoire gonadotrope hormonen niet spontaan plaatsvindt, zoals het konijn en de neonataal met androgeen gesteriliseerde rat. In de ovaria van deze dieren kunnen grote atretische follikels voorkomen (Barraclough 1961, Young 1961).

In hoofdstuk 6 zijn experimenten beschreven waaruit bleek dat het mogelijk was om met een kleine dosis hypofyse-extract in pre-ovulatoire follikels oöcytrijping te induceren zonder dat deze gevolgd werd door follikelsprong en luteïnisatie. Deze experimenten werden zowel in cyclische als in neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten uitgevoerd. Vlak voor de injectie met hypofyse-extract werden de cyclische dieren gehypofysectomeerd om de spontane afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen te voorkomen. Een gevolg van de hypofysectomie is dat de basissecretie van gonadotrope hormonen niet meer plaatsvindt. Teneinde deze basissecretie niet te verhinderen werden in één experiment neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten gebruikt. Bij deze dieren vindt geen spontane afgifte van ovulatoire gonadotrope hormonen plaats en het was daarom niet nodig deze dieren te hypofysectomereren. Twee dagen na de injectie met een kleine dosis hypofyse-extract bevatten de ovaria van zowel de gehypofysectomeerde cyclische als de niet-gehypofysectomeerde met androgeen gesteriliseerde ratten sterk atretische follikels. Hypofysectomie leidt altijd tot atresie van antrale follikels. Reeds enkele uren na hypofysectomie krijgt een antrale follikel kenmerken van atresie. Twee dagen na hypofysectomie zijn de follikels sterk atretisch. Het is daarom niet verwonderlijk dat de ovaria van de gehypofysectomeerde dieren atretische follikels bevatten. De neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten waren niet gehypofysectomeerd. De sterke atresie van de pre-ovulatoire follikels moest daardoor een andere oorzaak hebben.



Een follikel die eenmaal met de ontwikkeling begonnen is groeit voortdurend door (Pederson 1972). Daarom is mogelijk de doorsnede een maat voor de leeftijd van een follikel (Freeman et al 1970). De pre-ovulatoire follikels van neonataal met androgeen gesteriliseerde ratten zijn gemiddeld groter en daarom mogelijk ook ouder dan de pre-ovulatoire follikels van cyclische ratten. De atresie van de pre-ovulatoire follikels van de neonataal met androgeen gesteriliseerde dieren, zoals deze geconstateerd werd op de tweede dag na de behandeling met een kleine dosis hypofyse-extract, zou aldus ouderdom als oorzaak kunnen hebben en niet samenhangen met de behandeling met hypofyse-extract. Een andere mogelijkheid is dat deze atresie juist geïnduceerd is door de gonadotrope stimulus die weliswaar onvoldoende was voor follikelluteïnisatie maar voldoende voor de inductie van oöcytrijping. Welke van deze twee mogelijkheden de juiste is zou onderzocht kunnen worden met behulp van een hypofyse-extract en een met fysiologische zoutoplossing behandelde groep.

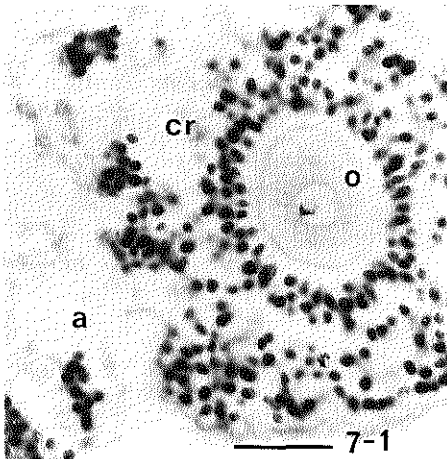
In de ovaria van neonataal gesteriliseerde ratten treedt een continue overgang van pre-ovulatoire naar atretische follikels op. Het is daardoor onmogelijk vast te stellen welke follikels twee dagen eerder pre-ovulatoir waren. Indien bij cyclische ratten de afgifte van ovulatie-inducerende hormonen twee achtereenvolgende dagen geblokkeerd wordt, dan zijn de follikels die twee dagen tevoren, op de pro-oestrus-dag, pre-ovulatoir waren zonder moeite te herkennen. Daarom werd besloten een experiment uit te voeren met cyclische ratten teneinde te onderzoeken of een gonadotrope stimulus, welke onvoldoende is voor luteïnisatie, follikelatresie tot gevolg heeft.

## 7.2. Materiaal en methode.

Cyclische vrouwelijke ratten (zie hoofdstuk 5) werden op pro-oestrus met Nembutal (33,3 mg/kg) geïnjectieerd om 13.45 uur om de spontane afgifte van ovulatoire hormonen te blokkeren. Vervolgens werden ze of met fysiologisch zout (controle groep) of met 1/32 RHE intraveneus geïnjectieerd. De dag daarna werd een dosis van 33,3 mg/kg Nembutal zowel om 10.00 als om 13.00 uur toegediend (Everett 1961). Dit teneinde de tweede dag de spontane afgifte van ovulatoire hormonen te voorkomen. Vijf en veertig uur na aanvang van de proef werden de dieren gedood en de ovaria gefixeerd. De ovaria werden in coupes van 10 $\mu$  gesneden. Alle coupes werden opgeplakt en gekleurd met hematoxyline-eosine.

## 7.3. Resultaten.

De microscopische anatomie van de generatie grootste follikels werd bestudeerd bij dieren die twee dagen na de injectie met fysiologisch zout of hypofyse-extract waren afgemaakt. Het bleek dat in de groep die met hypofyse-extract behandeld was een aantal follikels aan-



figuur 7-1. Foto van een coupe van een ovarium 1 dag na injectie met rattehypofyse-extract (1/32 RHE). De oöcyt (o) bevat een kern. De oöcyt wordt omgeven door een corona radiata (cr) en bevindt zich vrijzwevend in het antrum (a). De zwarte staaf geeft 50 $\mu$  weer.

wezig was met een kernhoudende oöcyt, welke omgeven was door een corona radiata (figuur 7-1). De oöcyt was vrijgekomen van de membrana granulosa en bevond zich vrij zwevend in het antrum. Indien oöcytrijping geïnduceerd was door een gonadotrope stimulus dan werd er altijd vorming van een corona radiata waargenomen. Voor de vorming van een corona radiata zijn blijkbaar minder gonadotrope hormonen nodig dan voor de inductie van oöcytrijping. Indien dit gegeven gecombineerd wordt met de resultaten van hoofdstuk 6 dan kan gesteld worden dat voor de inductie van a. de vorming van een corona radiata b. oöcytrijping c. luteïnisatie en d. follikelsprong in deze reeks oplopende hoeveelheden hypofyse-extract nodig zijn. Met dit gegeven kunnen de volgende stadia van intensiteit van follikelstimulatie worden onderscheiden (tabel 7-1).

De ovaria van de dieren die met een fysiologische zoutoplossing behandeld waren bevatten alleen follikels van stadium I. Er was geen enkel teken van extra gonadotrope stimulatie zichtbaar. De ovaria van de dieren die met 1/32 RHE geïnjectieerd waren bevatten follikels van al de 6 stadia. In tabel 7-2 zijn de resultaten van de met ratte-hypofyse-extract behandelde dieren weergegeven. Uit tabel 7-2 blijkt dat 5/6 dieren ovaria hadden waarin 4 follikel-stadia vertegenwoordigd waren. Hieruit is gecon-

tabel 7-1. Stadia van intensiteit van follikelstimulatie na injectie met rattehypofyse-extract zoals dit twee dagen na injectie op pro-oestrus met fysiologisch zout of 1/32 RHE werd geconstateerd. De spontane afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen werd gedurende twee achtereenvolgende dagen met Nembutal geblokkeerd.

---

<u>stadium</u>	I geen stimulatie
	II corona radiata gevormd
	III oöcytrijping
	IV gedeeltelijke luteïnisatie,1)
	V volledige luteïnisatie,1)
	VI follikelsprong

---

1). Zie hoofdstuk 6. RHE= rattehypofyse-eenheid, 1RHE is het extract van 1 ratte-hypofyse.

tabel 7-2. Weergave van de wijze waarop de pre-ovulatoire follikels per dier verdeeld zijn over de stadia van follikelstimulatie zoals dit twee dagen na injectie met 1/32 RHE werd waargenomen. De injectie met 1/32 RHE vond plaats op pro-oestrus. De spontane afgifte van een ovulatoire dosis gonadotrope hormonen werd gedurende twee achtereenvolgende dagen met Nembutal geblokkeerd.

dier no.	stadia van follikelstimulatie					
	I	II	III	IV	V	VI
1	1	7	3	1	-	-
2	-	3	8	3	3	1
3	2	7	1	5	-	-
4	-	9	1	2	1	-
5	-	7	3	-	-	-
6	-	5	5	2	-	2
totaal aantal follikels	79 ; 3	38	21	13	2	2

RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

tabel 7-3. Gemiddelde follikelatresie per stadium van intensiteit van follikelstimulatie twee dagen na injectie met fysiologisch zoutoplossing of 1/32 RHE op pro-oestrus bij dieren waarbij de spontane preovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen gedurende twee achtereenvolgende dagen met Nembutal geblokkeerd is.

behandeling	stadium van follikelstimulatie	gemiddelde <sup>1)</sup> follikelatresie ± sd
fysiologisch zout (iv)	I	2,8 ± 1,3 (n=42)
1/32 RHE (iv)	I	3,0 ± 2,7 (n= 3)
	II	2,8 ± 1,6 (n=38)
	III	5,2'' ± 1,6 (n=21)
	IV	6,9'' ± 1,9 (n=13)
	I+II+III+IV	4,2' ± 2,3 (n=75)

<sup>1)</sup>p<5%, <sup>''</sup>p<0,5% ten opzichte van de met fysiologisch zout behandelde groep (t toets).

1). Arbitraire eenheden van follikelatresie.

RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse, n= aantal follikels.

cludeerd dat de reactie per dier op een injectie met 1/32 RHE gelijk is. Op grond hiervan werden de follikels van deze 6 dieren als één populatie beschouwd.

De generatie grootste follikels van de met hypofyse-extract behandelde dieren waren in verschillende mate atretisch. Er was geen duidelijke grens tussen niet-atretische en atretische follikels. Om de mate van atresie te kunnen kwantificeren werd de verhouding tussen degenererende en niet-degenererende granulosa-cellen geschat. Er werd een schaal van atresie opgesteld met arbitraire eenheden van 0 tot 10. Een 0 betekent dat er geen degenererende granulosa-cellen waargenomen waren en een 10 betekent dat alle granulosa-cellen gedegeneerd waren. Met behulp van deze schaal werd de mate waarin een follikel atretisch was weergegeven. De mate van follikelatresie werd gemiddeld per stadium van follikelstimulatie (tabel 7-1). De volledig geluteïniseerde follikels (stadia V en VI) werden buiten beschouwing gelaten omdat in deze follikels gedegeneerde granulosa-cellen niet of nauwelijks voorkwamen. De resultaten zijn weergegeven in tabel 7-3.

Uit deze tabel blijkt dat de gemiddelde atresie per stadium van intensiteit van follikelstimulatie toeneemt. De verschillen tussen de groepen met en zonder oöcytrijping zijn significant.

#### 7.4. Discussie.

Follikels waarin oöcytrijping plaatsgevonden had en die niet of slechts gedeeltelijk geluteïniseerd waren, bevatten gemiddeld significant meer gedegeneerde granulosa-cellen dan follikels waarin de rijpingsdeling niet had plaatsgevonden (tabel 7-3). De conclusie die hieruit getrokken kan worden is: een gonadotrope stimulus die voldoende is voor de inductie van oöcytrijping maar onvoldoende voor de inductie van luteïnisatie heeft atresie

van de pre-ovulatoire follikel tot gevolg. Dat atresie op deze wijze veroorzaakt wordt kan ook uit de resultaten van Everett (1967) en Quinn en Everett (1967) worden afgeleid.

Oöcytrijping wordt ook bij een lage dosis van 1/32 RHE binnen tien uur na injectie met hypofyse-extract voltooid. Een groot percentage van de oöcyten die 18 uur na behandeling met hypofyse-extract gefixeerd waren en die zich nog in de follikels bevonden, bleken in hun cytoplasma verspreid liggende chromosomen van de tweede metafase te bevatten (niet gepubliceerde waarneming). Dit kan als kenmerk van degeneratie van de oöcyt worden beschouwd (Ingram 1962). Degeneratie van de oöcyt of van een stukje van de follikelwand zou tot atresie van de gehele follikel leiden (2.5). Een gonadotrope stimulus die onvoldoende is voor de inductie van luteïnisatie doch voldoende voor de inductie van oöcytrijping zou tot atresie van de follikel leiden omdat de oöcyt na voltooiing van de eerste rijpingsdeling degenerereert. De degeneratie van de follikel zou dan ongeveer 15 tot 20 uur na de inductie van de oöcytrijping aanvangen.

Indien de atresie van de follikel het gevolg is van degeneratie van de oöcyt (Ingram 1962) dan zou er tussen de niet-geluteïniseerde follikels met een gerijpte oöcyt en de gedeeltelijk geluteïniseerde follikels met een gerijpte oöcyt geen verschil mogen bestaan in de mate van atresie. De atresie van de niet-geluteïniseerde follikels is minder uitgebreid dan die van de gedeeltelijk geluteïniseerde follikels (stadia III en IV tabel 7-1). Dit betekent dat er mogelijk een andere oorzaak is voor de follikelatresie dan degeneratie van de gerijpte oöcyt. Wellicht is het een gonadotrope stimulus die juist onvoldoende is voor de inductie van luteïnisatie.

Een granulosa-cel vertoont na een gonadotrope stimulatie, welke ruim voldoende is voor luteïnisatie, degeneratieve kenmerken en differentieert zich vervolgens tot luteïne-cel (Pederson 1951). Deze kenmerken van degeneratie werden vóór de follikelsprong waargenomen. Een gonadotrope

stimulus die juist onvoldoende is voor luteïnisatie zou misschien tot gevolg hebben dat de granulosa-cellen niet door deze op degeneratie lijkende fase heenkomen. Dit zou tot atresie van de follikel leiden.

Mogelijk wordt atresie van de pre-ovulatoire follikel zowel door degeneratie van de gerijpte oöcyt als door een subluteïniserende gonadotrope stimulus geïnduceerd. Indien dit juist is zou de atresie van stadia III ongeveer 10 uur achterlopen bij de atresie van follikel-stadium IV. Er zou dan slechts een gering verschil tussen de mate van atresie van beide follikel-stadia mogen bestaan. Dit verschil is inderdaad gering. Het is nog niet mogelijk vast te stellen welke van de genoemde oorzaken van follikel-atresie de juiste is. Een oplossing kan gevonden worden in een experiment waarin gedeeltelijke luteïnisatie geïnduceerd zou worden zonder dat oöcytrijping plaatsvindt. Dit is mogelijk als eenzelfde experiment zoals in dit hoofdstuk beschreven is met HCG in plaats van met hypofyse-extract uitgevoerd wordt (hoofdstuk 5). Een combinatie van de uitkomsten van deze twee experimenten moet een definitieve conclusie over de oorzaak van atresie van pre-ovulatoire follikels mogelijk maken.

## Hoofdstuk 8. Steroïden en inductie van oöcytrijping.

### 8.1. Inleiding.

Het is reeds enkele tientallen jaren bekend dat de follikelsprong bij amfibieën onder invloed van steroïd-hormonen plaats kan vinden (Shapiro 1936, Zwarenstein 1937, Rondell 1974). Meer recent werd ontdekt dat ook de eerste rijpingsdeling van pre-ovulatoire oöcyten bij deze dieren onder invloed van steroïden (progesteron en bijnierschors-hormonen) hervat wordt (Schuetz 1967, Reynhout en Smit 1973). De rol van gonadotrope hormonen bij het rijpings- en ovulatieproces is bij amfibieën wellicht beperkt tot de inductie van de synthese van ovariële steroïden.

Bij zoogdieren is een verhoging van de ovariële progesteronsecretie binnen 5 tot 15 minuten na de aanvang van de ovulatoire gonadotrope stimulatie waarneembaar (Oxender et al 1971, Shaikh en Harper 1972, Labhsetwar et al 1973). Hiermede behoort de verhoging van progesteron-synthese tot de eerste veranderingen die in het ovarium na de ovulatoire gonadotrope stimulatie plaatsvinden. Progesteron zou dus een rol kunnen spelen bij de hervatting van de rijpingsdeling en bij de follikelsprong.

Progesteron induceert de synthese van proteolytische enzymen, welke de rekweerstand van de follikelwand doen verminderen zodat de follikelsprong door de overdruk die er in de follikel heerst, mogelijk wordt (Rondell 1964, 1970, 1974, Espey 1974). De follikelsprong kan met behulp van een steroïdsyntheseremmer geblokkeerd worden (Lipner en Wendelken 1971, Lipner en Greep 1971). Op grond van deze gegevens wordt aangenomen dat progesteron bij zoogdieren een belangrijke rol speelt bij de inductie van de follikelsprong.

Een rol van progesteron of van andere steroïden bij de inductie van de rijpingsdeling is tot nu toe niet



aangetoond (Schwartz en McCormack 1972, Tsafiriri et al 1972, 1973).

Rijping van zoogdieroöcyten na isolatie uit het ovarium is mogelijk in een cultuurmedium waaraan geen hormonen zijn toegevoegd. Verondersteld wordt dat gonadotrope hormonen oöcytrijping mogelijk maken door een verandering van het milieu waarin de oöcyt zich bevindt (Pincus en Enzmann 1935, Thibault 1972, Biggers 1972, Zeilmaker et al 1972). Indien blijken mocht dat bij zoogdieren steroïden een functie hebben bij de inductie van de rijpingsdeling dan betekent dit, dat onder invloed van een steroïd het milieu waarin de oöcyt zich bevindt dusdanig verandert dat oöcytrijping mogelijk wordt.

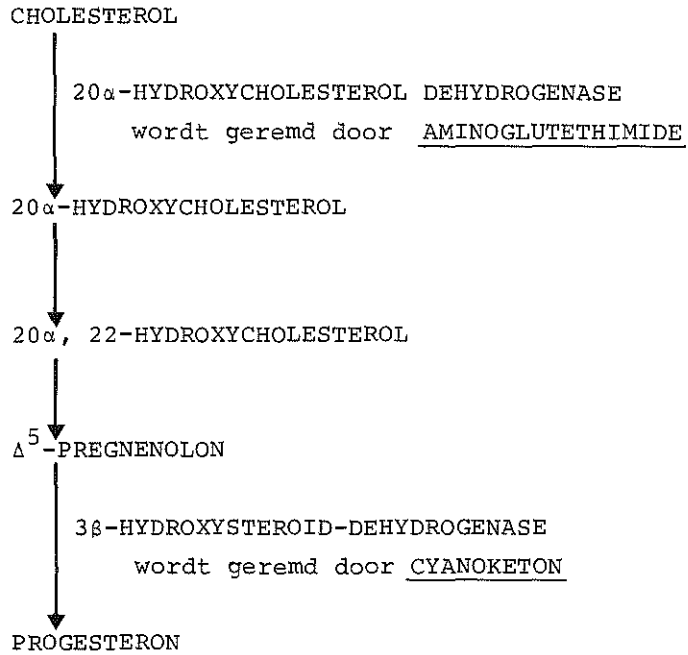
## 8.2. Materiaal en methode.

Een mogelijk bestaan van een relatie tussen steroïd-hormoon en oöcytrijping werd onderzocht met behulp van twee steroïdsyntheseremmers, n.l. met cyanoketon (2 $\alpha$  - cyano, 4, 4, 17 $\alpha$  - trimethyl - 17 $\beta$  - hydroxyandrost - 5 - en - 3 - on, Winthrop) en met aminoglutethimide (elipten, Ciba). In figuur 8-1 is de synthese van cholesterol naar progesteron schematisch weergegeven; tevens is weergegeven welke omzetting door aminoglutethimide en welke door cyanoketon geremd wordt.

Cyanoketon bindt zich stevig aan het enzym 3 $\beta$ -steroïd-dehydrogenase. Cyanoketon blijft na een injectie gedurende maanden zijn remmende werking uitoefenen (Bongiovanni et al 1967).

De beschikbare hoeveelheid cyanoketon was beperkt. Er konden slechts weinig proefdieren behandeld worden. Cyanoketon werd als een suspensie in olie subcutaan geïnjecteerd.

Aminoglutethimide remt de omzetting van cholesterol naar 20 $\alpha$ -cholesterol (Cohen 1968). Aminoglutethimide is



figuur 8-1. Schema van de synthese van progesteron vanuit cholesterol. Aangegeven is welk enzym met aminogluthetimide en welk enzym met cyanoketon geremd wordt (Goldman et al 1965, Kahnt en Neher 1966, Cohen 1968).

in oplossing niet goed houdbaar. Het moet vlak voor gebruik worden opgelost. Het heeft behalve naast het genoemde effect op de steroïdsynthese ook nog een sedatieve werking. Amino-glutethimide werd voor dit onderzoek door Ciba als een in water oplosbaar fosfaat ter beschikking gesteld. Het werd subcutaan geïnjectieerd.

De proeven werden steeds met cyclische dieren gedaan en behandeling vond op de dag van pro-oestrus plaats. Spontane afgifte van gonadotrope hormonen werd met Nembutal (33,3 mg/kg) of door hypofysectomie voorkomen. Details zijn bij de bespreking van de verschillende experimenten vermeld.

### 8.3. Resultaten.

#### 8.3.1. De invloed van cyanoketon op oöcytrijping en follikelsprong.

Achttien dieren werden tussen 13.30 en 13.45 uur op de dag van pro-oestrus met Nembutal (33,3 mg/kg) geïnjectieerd om de afgifte van endogene gonadotrope hormonen te blokkeren. Na de injectie met Nembutal volgde een subcutane injectie met cyanoketon in een dosis die varieerde van 0,9 tot 7,0 mg per 100 gram lichaamsgewicht. Twee uur na de cyanoketonbehandeling volgde een intraperitoneale injectie met 2 IU HCG. In tabel 8-1 is de ovulatierespons weergegeven. Uit deze tabel blijkt dat cyanoketon de follikel-

tabel 8-1. Ovulatierespons van cyclische dieren die twee uur na injectie met cyanoketon (sc) met 2 IU humaan choriongonadotropine geïnjectieerd werden.

ovulatierespons oöcyten/dier	dosis cyanoketon ( mg/ 100g lichaamsgewicht)			
	0,9	1,7	3,5	7,0
0	-	3/6	4/5	2/2
1-6	-	1/6	1/5	-
>6	2/2	2/6	-	-

sprong remt.

Na microscopisch onderzoek bleek dat alle niet-gesprongen pre-ovulatoire follikels, uitgezonderd die van één dier, volledig gerijpte oöcyten bevatten. Het dier waarvan niet alle pre-ovulatoire oöcyten gerijpt waren was met 7,0 mg cyanoketon per 100 gram lichaamsgewicht behandeld. Om te zien of cyanoketon de oöcytrijping kan voorkomen werden twee dieren vlak na de Nembu-tal-injectie met 3,5 mg cyanoketon per 100 gram lichaamsgewicht behandeld. Na twee uur volgde een injectie met 7,0 mg cyanoketon per 100 gram lichaamsgewicht. Twee uur na deze laatste behandeling volgde een injectie met 2 IU HCG. Microscopisch onderzoek van de ovaria van deze dieren, welke de volgende dag gefixeerd werden, liet zien dat alle pre-ovulatoire oöcyten gerijpt waren.

Er werd nog een poging ondernomen om te zien of cyanoketon de inductie van oöcytrijping remt. Twee dieren werden na injectie met 3,5 mg cyanoketon per 100 gram lichaamsgewicht geïnjectieerd met 1/32 RHE (ratte-hypofyse-eenheid, zie hoofdstuk 5). Dit is de kleinste dosis hypofyse-extract waarmee oöcytrijping geïnduceerd kan worden. Microscopisch onderzoek van de ovaria, welke een dag na de behandeling gefixeerd werden, leerde dat ook bij deze dieren alle pre-ovulatoire oöcyten gerijpt waren.

De resultaten van de experimenten die in deze paragraaf beschreven zijn leiden tot de conclusie dat met cyanoketon de oöcytrijping niet geremd kan worden.

### 8.3.2. De invloed van aminoglutethimidefosfaat op de rijpingsdeling.

8.3.2.1. Ter vergelijking met de eerste cyanoketonproef (8.3.1) werd een proef gedaan waarbij hetzelfde experimentele schema gevolgd werd met als enig verschil dat amino-

glutethimidefosfaat (AGF) in plaats van cyanoketon werd gebruikt. Vier dieren werden met 40 mg AGF geïnjectieerd. Een dier overleefde de behandeling en bij microscopisch onderzoek bleek dat de pre-ovulatoire oöcyten niet gerijpt waren. Een volgende groep van 4 dieren werd met 20 mg AGF behandeld. Een dag na de behandeling bleek dat ovulatie niet had plaatsgevonden. Bij microscopisch onderzoek bleek dat 3 van de 4 dieren geen gerijpte oöcyten hadden. Op grond van dit resultaat werd geconcludeerd dat AGF de oöcytrijping remt.

8.3.2.2. Het bewijs dat de remming van oöcytrijping door aminoglutethimide via een blokkade van de steroïdsynthese tot stand gebracht wordt is geleverd als injecties met steroïden waarvan de synthese geremd wordt zouden leiden tot oöcytrijping. Daarom werd het volgende experiment uitgevoerd:

13.30 uur	Nembutal-injectie (33,3 mg/kg ip)
15.30 uur	20 mg AGF (sc) of een gelijk volume fysiologische zoutoplossing
16.30 uur	1 ml olie, 25 mg progesteron in 1 ml olie of 25 mg pregnenolon in 1 ml olie
17.30 uur	2 IU HCG (ip) in 0,5 ml fysiologische zoutoplossing of alleen fysiologische zoutoplossing

De volgende morgen werd op ovulatie gecontroleerd en de ovaria werden voor microscopisch onderzoek gefixeerd.

De injectie met AGF geschiedde in tegenstelling tot het vorige experiment (8.3.2.1) twee uur na de injectie met Nembutal. AGF heeft evenals Nembutal tot gevolg dat de lichaamstemperatuur daalt. Een gelijktijdige Nembutal-AGF-behandeling werd hierom nadelig geacht. Om de afkoeling zoveel mogelijk tegen te gaan werden de dieren met watten toegedekt en onder een lamp geplaatst.

In totaal waren er vijf verschillende groepen (tabel 8-2). Bij geen enkele groep werd follikelsprong waargenomen. De resultaten van het microscopisch onderzoek met betrekking tot het voorkomen van oöcytrijping zijn weergegeven in tabel 8-2.

tabel:8-2. Het effect van aminoglutethimidefosfaat (AGF), progesteron en pregnenolon op de rijpingsdeling.

Proefschema: cyclische ratten 13.30 uur dag van pro-oestrus injectie met Nembutal om de spontane preovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen te blokkeren, 15.30 uur injectie met 20 mg AGF (sc) of een gelijk volume fysiologisch zout oplossing (sc), 16.30 uur injectie met 1 ml olie (sc) of 25 mg progesteron in 1 ml olie (sc) of 25 mg pregnenolon in 1 ml olie (sc), 17.30 uur injectie met 2 IU HCG (ip), volgende morgen fixatie ovaria.

behandeling			aantal ratten met gerijpte oöcyten/totaal aantal ratten per groep
20 mg AGF	olie	2 IU HCG	2/ 6
20 mg AGF	progesteron	2 IU HCG	5/10
20 mg AGF	pregnenolon	2 IU HCG	4/ 6
fysiologisch zout	progesteron	fysiologisch zout	0/ 2
idem	pregnenolon	fysiologisch zout	0/ 4

HCG= humaan choriogonadotropine.

Progesteron en pregnenolon bleken de rijpingsdeling niet te kunnen induceren. De remming van de oöcytrijping in de AGF-HCG-groep kwam overeen met de vorige proefgroep (8.3.2.1, laatste groep). Zowel progesteron als pregnenolon hadden in vergelijking met de 20 mg AGF/olie/2 IU HCG-groep een groter aantal dieren met gerijpte oöcyten tot gevolg; doch het verschil met de 20 mg AGF/olie/2 IU HCG-groep was echter niet significant (Fischer test).

Het was opmerkelijk dat een dier uit de AGF/olie/HCG-groep twee oöcyten bevatte die de rijpingsdeling niet voltooid hadden. Eén oöcyt verkeerde in de anafase en de andere was in het chromatine-massa-II-stadium (a). In de groep die met AGF/progesteron/HCG behandeld was bevatte een pre-

ovulatoire follikel een oöcyt die in de telofase was (b). Tot de groep die met AGF/pregnenolon/HCG behandeld was behoorden twee dieren waarvan niet alle pre-ovulatoire oöcyten de eerste rijpingsdeling voltooid hadden. Bij één dier waren er 9 van de 12 pre-ovulatoire oöcyten gerijpt (c) en bij het andere dier bevond zich één oöcyt in de telofase (d). De intervallen tussen injectie en moment van autopsie waren bij deze dieren respectievelijk 14,5 uur (a), 16 uur (b) en 15,6 uur (d). Dit betekent dat 14,5 uur, 16 uur en 15,6 uur na de injectie met HCG de rijpingsdeling nog niet voltooid was. Normaliter is ongeveer 11 uur na HCG-injectie de rijpingsdeling voltooid (hoofdstuk 5). De voltooiing van de eerste rijpingsdeling vraagt na een AGF-behandeling blijkbaar meer tijd.

Uit deze resultaten werd geconcludeerd dat AGF de door HCG geïnduceerde oöcytrijping kan remmen of vertragen. Uit de in tabel 8-2 gepresenteerde resultaten kan echter niet geconcludeerd worden dat het effect van AGF op de rijpingsdeling via een blokkade van de steroïdsynthese verloopt.

8.3.2.3. De halfwaarde-tijd van AGF is niet precies bekend. Mogelijk is een interval van 2 uur tussen AGF en gonadotrope-behandeling niet genoeg om de effecten van AGF op de rijpingsdeling te onderzoeken. Het in deze paragraaf beschreven experiment werd uitgevoerd om bij de kleinste dosis AGF die ovulatie kan blokkeren een optimaal interval te vinden voor de injectie met 2 IU HCG. Er werden twee dosis-groepen gekozen: 2,5 en 5 mg AGF. De proefdieren werden 5, 15, 30 en 60 minuten na de AGF-behandeling met 2 IU HCG intraperitoneaal geïnjectieerd. Een dag daarna werd op ovulatie gecontroleerd. Injectie met Nembutal vond plaats op de dag van pro-oestrus om 13.45 uur. Twee uur later volgde de behandeling met AGF. De ovulatierepons is weergegeven in tabel 8-3. Uit tabel 8-3 blijkt dat 2,5 mg

tabel 8-3. Ovulatierepons van cyclische ratten na injectie met 2,5 of 5 mg AGF(sc) en injectie met 2 IU HCG (ip) 5, 15, 30 of 60 min later. De injectie met AGF vond plaats op pro-oestrus om 15.45 uur, 2 uur na de injectie met Nembutal.

	interval AGF - HCG behandeling							
	5 min		15 min		30 min		60 min	
	mg AGF		mg AGF		mg AGF		mg AGF	
ovulatierepons oöcyten/dier	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5
0	-	-	-	-	-	3/5	1/5	2/5
1-6	-	-	-	-	1/5	1/5	-	-
>6	5/5	2/2	5/5	5/5	4/5	1/5	4/5	3/5

AGF= aminoglutethimidefosfaat, HCG= humaan choriongonadotropine.

AGF altijd of vrijwel altijd onvoldoende is om ovulatie die met 2 IU HCG geïnduceerd is te blokkeren. Eveneens blijkt dat indien 5 mg AGF 30 minuten voor de injectie met 2 IU HCG wordt toegediend blokkade van de follikelsprong mogelijk is (3/5).

De ovaria van de dieren die minder dan 6 oöcyten geovuleerd hadden werden microscopisch onderzocht. Het bleek dat een dier uit de 2,5 mg AGF-60 minuten-groep geen gerijpte oöcyten had. Een dier uit de 5 mg - 30 minuten-groep en twee dieren uit de 5 mg - 60 minuten-groep bezaten eveneens geen gerijpte oöcyten. Voorts bevatten de ovaria van één dier uit de 2,5 mg - 30 minuten-groep vier niet-gerijpte pre-ovulatoire oöcyten.

8.3.2.4. Het effect van een kleine dosis HCG op oöcytrijping en follikelsprong is moeilijk voorspelbaar. Er blijkt geen duidelijk verschil te zijn in de respons van dieren die met 0,3, 0,4 en 0,5 IU HCG (iv) behandeld zijn (tabel 6-1). Het effect van een kleine dosis hypofyse-extract op de inductie van oöcytrijping daarentegen bleek goed te voorspellen. Om deze reden werd besloten van HCG over te gaan op hypofyse-extract. Gekozen werd voor een dosis van 1/16 RHE. Deze dosis heeft altijd oöcytrijping



tot gevolg maar is niet of nauwelijks voldoende voor de inductie van follikelsprong. Op grond van de resultaten van paragraaf 8.3.2.3. werd gekozen voor een interval van 30 minuten tussen de injectie met 5 mg AGF (sc) en hypofyse-extract injectie (iv). Om er zeker van te zijn dat geen afgifte van endogene gonadotrope hormonen plaats zou vinden werden de proefdieren op de dag van pro-oestrus gehypofysectomeerd tussen 11.00 en 12.00 uur. Het proefschema zag er als volgt uit:

pro-oestrus ratten:	11.00 - 12.00	uur hypofysectomie
	13.00	uur 5 mg AGF (sc)
	13.30	uur 1/16 RHE (iv)
volgende dag	: 9.00 - 11.00	uur aanprikken van pre-ovulatoire follikels

De volgende morgen werden de grote follikels aangeprikt en de oöcyten die vrijkwamen werden op een object-glasje onder de microscoop bekeken. Met deze methode kan de aan- en afwezigheid van een kern worden waargenomen. Deze methode is minder nauwkeurig dan een histologische procedure doch werkt sneller. In totaal werden 5 dieren op deze wijze behandeld. Het aantal gemiddelde kernloze oöcyten bedroeg zes per dier. Op grond van dit resultaat werd besloten de dosis AGF te verhogen tot 10 mg. Voorts werd nagegaan of het interval tussen AGF-behandeling en hypofyse-extract-injectie van belang was. Het experiment werd verder op dezelfde wijze uitgevoerd. De resultaten zijn weergegeven in tabel 8-4.

Bij het aanprikken gaat soms een oöcyt verloren of worden niet alle pre-ovulatoire follikels gevonden. Dit verklaart waarom het aantal oöcyten dat per dier gevonden is, kleiner is dan het aantal pre-ovulatoire oöcyten dat deze rattend normaal heeft ( $\pm 12$ ).

Uit de in tabel 8-4 gepresenteerde resultaten kan geconcludeerd worden dat in dit proefschema aminoglutethimide

de inductie van oöcytrijping door hypofyse-extract niet remt.

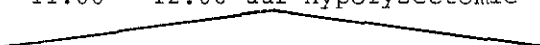
tabel 8-4. Aantal gerijpte oöcyten per dier na injectie met 10 mg AGF (sc) en injectie met 1/16 RHE (iv) 5, 30 of 60 min later. Cyclische ratten werden gehypofysectomeerd op pro-oestrus tussen 11.00 en 12.00 uur, injectie met AGF vond om 13.00 uur plaats.

interval AGF -- hypofyse-extractinjectie					
5 min		30 min		60 min	
dier no. 1	8	dier no. 1	11	dier no. 1	10
2	12	2	10	2	10
3	10	3	9		

AGF= aminoglutethimidefosfaat, RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

8.3.2.5. Bij de in paragraaf 8.3.2.4. beschreven experimenten bleek het niet mogelijk een met hypofyse-extract geïnduceerde rijpingsdeling te remmen. Getracht werd met een ander proefschema oöcytrijping met AGF te blokkeren. Na hypofysectomie werd 2 of 3x met intervallen van een uur 10 mg AGF geïnjectieerd (sc). Een uur na de laatste AGF-injectie werd 1/16 RHE intraveneus geïnjectieerd. De ovaria werden een dag later gefixeerd voor microscopisch onderzoek. Het proefschema zag er als volgt uit:

ratten in pro-oestrus  
11.00 - 12.00 uur hypofysectomie



13.00 uur 10 mg AGF (sc)	13.00 uur 10 mg AGF (sc)
14.00 uur 10 mg AGF (sc)	14.00 uur 10 mg AGF (sc)
15.00 uur 1/16 RHE (iv)	15.00 uur 10 mg AGF (sc)
	16.00 uur 1/16 RHE (iv)

volgende dag fixatie ovaria voor microscopisch onderzoek

De resultaten zijn vermeld in tabel 8-5.

In de groep die met 2 x 10 mg AGF behandeld was waren alle pre-ovulatoire oöcyten gerijpt. In de groep die met 3 x 10 mg AGF behandeld was bezat dier no. 1 twee oöcyten die zich in de anafase bevonden. Dit was een eerste aanwijzing voor interferentie van AGF met een door hypofyse-extract geïnduceerde rijpingsdeling.

tabel 8-5. Aantal gerijpte oöcyten per dier na 2 of 3 maal een injectie met 10 mg AGF (sc) met intervallen van 1 uur. Eén uur na de laatste injectie met AGF volgde een injectie met 1/16 RHE (iv). Cyclische ratten werden gehypofysectomeerd op pro-oestrus tussen 11.00 en 12.00 uur, de eerste injectie met AGF vond om 13.00 uur plaats.

dosis AGF			
2 x 10 mg		3 x 10 mg	
dier no. 1	13	dier no. 1	9
2	16	2	14
3	13	3	12
4	13	4	12

AGF= aminoglutethimidefosfaat, RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

8.3.2.6. De door hypofyse-extract geïnduceerde rijpingsdeling kon met AGF niet geremd worden maar de mogelijkheid dat AGF een effect had op het tijdschema van de rijpende oöcyt kon niet worden uitgesloten. Tot deze fase van het onderzoek was het effect van AGF op de rijpingsdeling bestudeerd in ovaria die tenminste 14 uur na de injectie met hypofyse-extract gefixeerd waren. De voltooiing van de rijpingsdeling vindt na injectie met 2 RHE na ongeveer 9 uur plaats (figuur 5-2). Het verschil tussen 9 en 14 uur werd te groot geacht om een vertraging in het tijdschema van de eerste rijpingsdeling te kunnen bestuderen daar deze vertraging dan tenminste vijf uur groot moet zijn om vastgesteld te kunnen worden. In de volgende proef werd 3 en 4 uur na de injectie met hypofyse-extract ovariectomie uitgevoerd. Er waren twee proefdiergroepen: één groep die subcutaan met fysiologisch zout en één die subcutaan met 10 mg AGF werd

geïnjectieerd. Een half uur na de injectie met AGF of de injectie met fysiologische zoutoplossing werden de proefdieren met 1/16 RHE ingespoten. Vlak voor de injectie met AGF of fysiologisch zout werden de dieren gehypofysectomeerd. De resultaten van het microscopisch onderzoek zijn weergegeven in de tabellen 8-6 en 8-7. Van de controle-

tabel 8-6. Aantal oöcyten per rat dat zich na hypofysectomie tussen 11.00 en 12.00 uur op de dag van pro-oestrus na een injectie met fysiologische zoutoplossing (sc) om 13.00 uur en injectie met 1/16 RHE (iv) om 13.30 uur 3 en 4 uur na deze injectie met hypofyse-extract zich in het chromatinemassa-I- en diakinesestadium bevinden.

interval injectie met hypofyse-extract en ovariëctomie					
		3 uur		4 uur	
		stadium oöcytrijping		stadium oöcytrijping	
		CM-I	D	CM-I	D
dier no. 1					
dier no. 1	-	6		-	7
2	4	2		-	5
3	1	6		-	6
4	3	4		-	4
5	2	7		-	4
totaal	10	25		0	26

CM-I= chromatinemassa-I-stadium, D= diakinesestadium, RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

tabel 8-7. Aantal oöcyten per rat dat zich na hypofysectomie tussen 11.00 uur en 12.00 uur op de dag van pro-oestrus na injectie met 10 mg aminoglutethimidefosfaat (sc) om 13.00 uur en injectie met 1/16 RHE (iv) om 13.30 uur 3 en 4 uur na deze injectie met hypofyse-extract zich in het chromatinemassa-I- en diakinesestadium bevinden.

interval injectie met hypofyse-extract en ovariëctomie					
		3 uur		4 uur	
		stadium oöcytrijping		stadium oöcytrijping	
		CM-I	D	CM-I	D
dier no. 1					
2	4	3		-	5
3	6	-		3	4
4	3	2		-	7
5	5	1		-	3
6	6	-		1	6
totaal	28	9		4	30

CM-I= chromatinemassa-I-stadium, D= diakinesestadium, RHE= rattehypofyse-eenheid, 1 RHE is het extract van 1 rattehypofyse.

groep was bij de ovaria die 3 uur na de behandeling met hypofyse-extract gefixeerd waren de verhouding tussen het aantal oöcyten dat zich in chromatine-massa-I tot het aantal oöcyten dat zich in het diakinese-stadium bevond 10:25 (tabel 8-6). Bij de AGF-behandelde dieren was deze verhouding omgekeerd; 28:9 (tabel 8-7). Volgens de  $\chi^2$  toets is dit verschil significant ( $p < 0,001\%$ ). In de na 4 uur gefixeerde ovaria werden geen verschillen gevonden. Blijkbaar heeft AGF een vertragend effect op de aanvang van de rijpingsdeling wanneer deze door hypofyse-extract geïnduceerd wordt. Waarschijnlijk vergroot AGF het interval dat ligt tussen het moment van hypofyse-extract-injectie en het moment waarop de kern verdwijnt.

#### 8.4. Discussie.

Een dosis van 2 IU HCG is bij ratten in pro-oestrus ruim voldoende voor de inductie van de follikelsprong (hoofdstuk 5). Bij dieren die 2 uur voor de HCG-behandeling een injectie met cyanoketon gekregen hadden vond de follikelsprong niet plaats (8.3.1). Cyanoketon remt de progesteronsynthese. Het is dus waarschijnlijk dat bij een blokkade van de progesteronsynthese de follikelsprong niet plaatsvindt. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Lipner en Wendelken (1971) en Lipner en Greep (1971) die tot zes uur na de HCG-behandeling de follikelsprong met cyanoketon konden blokkeren.

Het interval tussen de tijdstippen van behandeling met cyanoketon en HCG bedroeg aanvankelijk 2 uur. Volgens Bongiovanni et al (1967) vindt er 3 uur na cyanoketon-behandeling een remming van de synthese van bijnierschorssteroiden plaats. Daarom werd een cyanoketoninjectie 4 en 2 uur voor de behandeling met HCG toegediend (blz. 116) maar ook na deze behandeling vond er rijping van alle pre-ovulatoire oöcyten plaats. Ook Tsafiriri et al (1972)

konden met behulp van cyanoketon niet voorkomen dat LH de rijpingsdeling induceerde bij oöcyten die zich bevonden in uit het ovarium geïsoleerde pre-ovulatoire follicels. Uit de resultaten van Tsafiriri et al (1972) en de resultaten van par. 8.3.1. kan geconcludeerd worden dat cyanoketon een door LH of HCG geïnduceerde rijpingsdeling niet kan blokkeren. Er kan echter niet geconcludeerd worden dat bij een volledige remming van de steroïdsynthese de oöcytrijping toch plaatsvindt omdat het niet zeker is dat de gebruikte dosis cyanoketon inderdaad volledige remming van de steroïdsynthese tot gevolg had. Het was mogelijk om met een andere steroïdsyntheseremmer, aminoglutethimide, de invloed van HCG op de oöcytrijping tegen te gaan (par. 8.3.2.1. en 8.3.2.2). Indien remming van de oöcytrijping inderdaad door de afwezigheid van ovariële steroïden veroorzaakt zou worden dan zou door een injectie met deze steroïden het effect van aminoglutethimide tenietgedaan kunnen worden. De resultaten van tabel 8-2 laten zien dat een extra progesteron- of pregnenolon-behandeling tot gevolg heeft dat in vergelijking met de controledieren, bij een groter percentage dieren oöcytrijping optreedt (respectievelijk bij 5/10, bij 4/6 en bij 2/6 dieren, tabel 8-2 eerste 3 kolommen). Deze verschillen worden onvoldoende geacht om er een definitieve conclusie aan te verbinden. Zij geven echter aanleiding een herhaling van een dergelijk experiment te rechtvaardigen. Wel kan geconcludeerd worden dat aminoglutethimide de inductie van de rijpingsdeling door HCG kan blokkeren. Tot dezelfde proefdiergroep behoorden drie dieren die tenminste 14 uur na de HCG-injectie nog oöcyten bezaten die de rijpingsdeling niet voltooid hadden. Deze 14 uur is aanzienlijk langer dan op grond van de resultaten van hoofdstuk 5 verwacht zou mogen worden. Blijkbaar kan aminoglutethimide de inductie van de rijpingsdeling door HCG uitstellen of kan aminoglutethimide het tijdschema van de rijpings-

deling, wanneer deze aangevangen is, beïnvloeden. Het is misschien mogelijk dat na aminoglutethimide en HCG-behandeling er een blokkade op het metafase-I-stadium plaatsvindt, zoals deze soms waargenomen is in oöcyten van *in vitro* geïncubeerde pre-ovulatoire follikels (Tsafriri et al 1972).

Opvallend is dat bij eenzelfde behandeling binnen één groep sommige dieren geen enkele gerijpte oöcyt bezaten en andere slechts gerijpte oöcyten. Een vergelijkbaar resultaat werd verkregen na intraveneuze injectie met een kleine dosis HCG (0,3 - 0,5 zie hoofdstuk 5). Hier was het resultaat van de injectie moeilijk te voorspellen. De grote verschillen binnen een groep na aminoglutethimide en HCG-behandeling zouden veroorzaakt kunnen worden door een "marginaal HCG-effect".

Een behandeling met aminoglutethimide en hypofyse-extract had geen blokkade van de oöcytrijping tot gevolg. Wel werden 14 uur na de hypofyse-extract-behandeling twee oöcyten aangetroffen die de eerste rijpingsdeling niet voltooid hadden (8.3.2.5). Voorts werd uit de resultaten van par. 8.3.2.6. geconcludeerd dat aminoglutethimide wel een vertragend effect heeft op de inductie van de rijpingsdeling.

Samenvattend kan gezegd worden dat de inductie van de rijpingsdeling door HCG met aminoglutethimide geblokkeerd kan worden. De inductie van de rijpingsdeling door hypofyse-extract kan door aminoglutethimide niet geblokkeerd doch wel vertraagd worden. Het verloop van de rijpingsdeling kan door aminoglutethimide worden beïnvloed onafhankelijk van het feit of de inductie door HCG dan wel door hypofyse-extract plaatsgevonden heeft.

Deze experimenten zijn uitgevoerd teneinde de gevolgen van een blokkade op de steroïdsynthese voor de rijpingsdeling te bestuderen. Niet geconcludeerd kon worden of deze effecten veroorzaakt zijn door een blokkade van de steroïdsynthese. Het effect van aminoglutethimide op de rijpingsdeling

wanneer de inductie van de rijpingsdeling door HCG plaatsvindt is anders dan wanneer de inductie geschiedt door hypofyse-extract. Dit sluit een directe remming van de rijpingsdeling door aminoglutethimide uit en laat de mogelijkheid open dat in geval van HCG-behandeling de inductie van de rijpingsdeling via de inductie van steroid-synthese plaatsvindt.



## Hoofdstuk 9. Samenvatting en conclusies van het experimenteel gedeelte.

De morfologie van de eerste rijpingsdeling van pre-ovulatoire oöcyten werd bij de rat bestudeerd. De diakinese-chromosomen worden bij de rat zichtbaar nadat de membraan van de centraal gelegen kern in elkaar gevallen is. Bij andere diersoorten condenseren de diakinese-chromosomen op een nog intact zijnde, tegen het oölemma gelegen, kernmembraan.

Een ovulatoire hoeveelheid gonadotrope hormonen induceert in een pre-ovulatoire follikel onder meer: oöcytrijping, luteïnisatie en follikelsprong. Luteïnisatie en follikelsprong worden beide gebruikt als index voor gonadotrope stimulatie. Onderzocht werd of oöcytrijping een bruikbare index voor gonadotrope stimulatie is en of met behulp van het tijdschema van het verloop van de eerste rijpingsdeling het tijdstip van gonadotrope stimulatie bepaald kon worden. Het interval tussen het tijdstip van gonadotrope-behandeling en het moment waarop de kern van de oöcyt verdwijnt bleek afhankelijk van de aard van het gebruikte gonadotropine (1,5 - 2,5 uur). Het interval tussen het moment waarop de kern verdwijnt en het tijdstip waarop de oöcyt in de metafase van de tweede rijpingsdeling komt, blijkt onafhankelijk van de hoeveelheid en de aard van het gebruikte gonadotropine (7 - 7,5 uur). Voor de inductie van oöcytrijping, luteïnisatie (corpus luteum-vorming) en follikelsprong zijn in genoemde volgorde toenemende hoeveelheden hypofyse-extract nodig. Gedeelten van de membrana granulosa luteïniseren zonder dat dit noodzakelijkerwijs gepaard gaat met rijping van de oöcyt in dezelfde follikel bij dieren, die met een kleine dosis humaan chorion-gonadotropine behandeld zijn (0,3 - 0,5 IU HCG). Luteïnisatie en oöcytrijping kunnen derhalve onafhankelijk van elkaar geïnduceerd worden.

Het tijdschema van het verloop van de eerste rijpingsdeling kan gebruikt worden om het tijdstip van gonadotrope stimulatie te bepalen. Oöcytrijping is een meer gevoelige index voor gonadotrope stimulatie dan corpus luteumvorming en follikelsprong.

Met behulp van Nembutal werd bij ratten in pro-oestrus de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen gedurende twee achtereenvolgende dagen geblokkeerd. Deze ratten werden op de dag van de eerste Nembutal-behandeling geïnjectieerd met een dosis hypofyse-extract welke voldoende was voor de inductie van oöcytrijping maar onvoldoende voor de inductie van luteïnisatie en follikelsprong. Twee dagen na de injectie met hypofyse-extract bleek dat de pre-ovulatoire follikels atretisch waren. In eenzelfde proefopstelling waarbij fysiologisch zout in plaats van hypofyse-extract geïnjectieerd werd bleken de pre-ovulatoire follikels niet atretisch. Geconcludeerd werd dat een dosis gonadotrope hormonen welke onvoldoende is voor de inductie van luteïnisatie versnelde atresie van de follikel tot gevolg heeft.

De gonadotrope hormonen die pre-ovulatoir afgegeven worden induceren een verandering in de steroïd-hormoon-synthese in het ovarium. De synthese van oestrogene hormonen wordt beëindigd en die van progesteron komt op gang. Deze verandering in de steroïdsynthese behoort tot de eerst waarneembare veranderingen in het ovarium na de aanvang van de pre-ovulatoire afgifte van gonadotrope hormonen. Onderzocht werd of genoemde verandering in de steroïdsynthese van belang is voor de inductie van oöcytrijping. Een steroïdsyntheseremmer (aminoglutethimide) kan onder bepaalde omstandigheden de inductie van oöcytrijping na humaan chorion-gonadotropine-injectie blokkeren. Oöcytrijping kon door aminoglutethimide niet geremd worden wanneer deze met hypofyse-extract geïnduceerd is. Geconcludeerd is dat voor de inductie van oöcytrijping door humaan chorion-gonadotropine steroïd-hormonen mogelijk een rol spelen. Inductie van oöcytrijping door hypofyse-extract vindt onafhankelijk van steroïd-hormonen plaats.

## Summary and conclusions of the experimental work.

The morphology of the first maturation division of pre-ovulatory oocytes was studied in rat. Diakinesis chromosomes were visible after the collapse of the nuclear membrane. This is in contrast with other species, in which the diakinesis chromosomes condense on the intact nuclear membrane, while the nucleus is situated against the oolemma.

An ovulatory quantity of gonadotrophic hormones induces oocyte maturation, luteinization and follicle rupture in pre-ovulatory follicles. Luteinization and follicle rupture are both used as an index of gonadotrophic stimulation. The present investigation was carried out to see whether a) oocyte maturation may be a useful index of gonadotrophic stimulation and b) whether by observing the time course of the first maturation division the precise time of gonadotrophic stimulation could be determined. The interval between the gonadotrophic treatment and the oocyte nuclear membrane collapse, appeared to be dependent on the type of gonadotrophin administered (1.5 - 2,5 hours). The interval between the nuclear membrane collapse and the time when the oocyte comes into the metaphase of the second maturation division, appears to be independent on the quantity and the type of gonadotrophin used (7 - 7,5 hours). In order to induce oocyte maturation, luteinization (corpus luteum formation) and follicle rupture, in this order it was found that increasing amounts of pituitary extract were required. Parts of the membrana granulosa luteinized without concomittant oocyte maturation in the same follicle of animals injected with a small dose of human chorionic gonadotrophin (0.3 - 0.5 IU HCG). Luteinization and oocyte maturation therefore can be induced independently of each other.

The time course of the first maturation division can be used to determine the time of gonadotrophic stimulation. Oocyte maturation is a more sensitive index of gonadotrophic

stimulation than either corpus luteum formation or follicle rupture.

With the aid of Nembutal the pre-ovulatory release of gonadotrophic hormones was blocked in pro-oestrous rat for two successive days. On the day of the first Nembutal treatment these rats were injected with a dose of pituitary extract which was sufficient to induce oocyte maturation, but insufficient to induce luteinization and follicle rupture. Two days after the pituitary extract injection the pre-ovulatory follicles were found to be atretic. In a control group of rats in which saline was injected instead of pituitary extract, the pre-ovulatory follicles were found to be non-atretic. It was concluded that a dose of gonadotrophic hormones which is insufficient to induce luteinization results in an accelerated atresia of the follicle.

The gonadotrophic hormones which are released pre-ovulatory induce a change in the steroid hormone synthesis within the ovary. Oestrogenic hormone synthesis is completed and progesterone synthesis is started. This change in steroid synthesis represents the first perceptible change within the ovary after the beginning of the pre-ovulatory release of gonadotrophic hormones. It was investigated whether this change in steroid synthesis is of importance for the induction of oocyte maturation. Under certain circumstances a steroid inhibitor (aminoglutethimide) may block oocyte maturation induced by injection of chorionic gonadotrophins. Oocyte maturation when induced by injection of pituitary extract could not be blocked by aminoglutethimide. It is concluded that steroid hormones may play a role in the induction of oocyte maturation induced by human chorionic gonadotrophin. Induction of oocyte maturation by pituitary extract occurs independently of steroid hormones.

## Litteratuur

- Allen, E. 1922, Am J Anat 30:297
- Allen, E. 1923, Am J Anat 31:439
- Anderson, E. 1972 In: Oogenesis, Red. J.D. Biggers & A.W. Schuetz blz. 87, University Park Press, Baltimore
- Anderson, E., Condon, W. & Sharp, D. 1970, J Morph 130:67
- Anderson, W.A. 1972, Microvasc R 4:348
- Austin, C.R. 1961, The mammalian egg, Blackwell Scient Publications, Oxford
- Austin, C.R. 1972 In: Reproduction in Mammals I, Germ cells and Fertilization, Red. C.R. Austin & R.V. Short, blz. 103, University Press, Cambridge
- Austin, C.R. & Bishop, M.W.H. 1959, Exp Cell Re 17:35
- Austin, C.R. & Braden, A.W.H. 1953, Aust J Biol Sci 6:324
- Ayalon, D., Tsafiriri, A., Lindner, H.R., Cordova, T. & Harell, A. 1972, J Repr Fert 31:51
- Baker, T.G. 1970, Bio Sci 6:7
- Baker, T.G. 1972a In: Reproductive Biology, eds. H. Balin & S. Glasser, blz. 398, Excerpta Medica, Amsterdam
- Baker, T.G. 1972b In: Reproduction in mammals I, Germ cells and Fertilization, Red. C.R. Austin & R.V. Short, blz. 14, University Press, Cambridge
- Baker, T.G., Beaumont, H.M. & Franchi, L.L. 1969, J Cell Sci 4:655
- Baker, T.G. & Neal, P. 1972 In: Oogenesis, eds. J.D. Biggers & A.W. Schuetz, blz. 377, University Park Press, Baltimore
- Barker, T.E. & Walker, B.E. 1966, Anat Rec 154:149
- Barraclough, C.A. 1961, Endocrinol 68:62
- Barros, C. & Yanagimachi, R. 1971, Nature 233:268
- Beaumont, H.M. & Mandl, A.M. 1962, Proc Roy Soc B 155:557
- Beatty, R.A. 1967 In: Fertilization, Red. C. Metz & A. Monroug, vol. 1, blz. 413, Academic Press, New York
- Beatty, R.A. 1972 In: Oogenesis, Red. J.D. Biggers & A.W. Schuetz, blz. 277, University Park Press, Baltimore

- Beneden, E. van 1875, Bull Ac Roy Sci Belge 40:686
- Beneden, E. van & Julin, C. 1880, Arch Biol 1:551
- Benirschke, K. & Sullivan, M.M. 1966, Fert Steril 17:24
- Biggers, J.D. 1972 In: Oogenesis, Red. J.D. Biggers & A.W. Schuetz, blz. 241, University Park Press, Baltimore
- Blacker, A.W. 1966 Adv Physl 1:9
- Blandau, R.J., White, B.J. & Rumery, R.E. 1963, Fert Steril 14:482
- Bloom, A.M. & Mukherjee, B.B. 1972, Exp Cell Re 74:577
- Bongiovanni, A.M., Eberlein, W.R., Goldman, A.S. & New, M. 1967, Rec Progr Horm Re 23:375
- Borum, K. 1966, Exp Cell Re 45:39
- Boyd, J.D. & Hamilton, W.J. 1955 In: Modern Trends in Obstetrics and Gynaecology, 2nd ser, Red. K. Bowes, blz. 50, Butterworth, Londen
- Braden, A.W.H., Austin, C.R. & David, H.A. 1954, Aust J Biol Sci 7:391
- Brambell, F.W.R. 1956 In: Marshall's Physiology of Reproduction, Red. A.S. Parkes, Vol. I-1, blz. 397, Longmans, Londen
- Brown-Grant, K., Exley, D. & Naftolin, F. 1970, J Endocr 48:295
- Burkholder, G.D., Comings, D.E. & Okada, T.A. 1971, Exp Cell Re 69:361
- Butcher, R.L., Collins, W.E. & Fugo, N.W. 1974, Endocrinol 94:1704
- Chiquoine, A.D. 1954, Anat Rec 118:135
- Chiquoine, A.D. 1960, Am J Anat 106:149
- Chouinard, L.A. 1973, J Cell Sci 12:55
- Chretien, Fr.Ch. 1966, J Emb Exp M 16:591
- Cohen, M.P. 1968, P Soc Exp M 127:1086
- Cole, H.H. 1969 In: Reproduction of domestic animals, Red. H.H. Cole & P.T. Cupps, blz 17, Academic Press, New York

- Cowperthwaite, M.H. 1925, Am J Anat 36:39
- Cross, B.A. & Dyer, R.G. 1971, J Phys L 212:467
- Cross, P.C. 1971, J Repr Fert 25:291
- Davidson, E.H. 1968, Gene activity in early development,  
Academic Press, London
- Edwards, R.G. & Gates, A.H. 1959, J Endocr 18:292
- El-Fouly, M.A., Cooke, B., Nekola, M. & Nalbandov, A.V.  
1970, Endocrinol 87:288
- Eshkol, A., Lunenfeld, B. & Peters, H. 1970 In: Gonado-  
trophines and ovarian development, Red. W.R. Butt,  
A.C. Crooke & M. Ryle, blz. 249, E.S. Livingstone,  
Edinburgh
- Espey, L.L. 1974, Biol Reprod 10:216
- Evans, H.M. & Swezy, O. 1931, Mem Univ Calif 9:119
- Everett, J.W. 1961 In: Sex and internal secretions, 3rd  
edn, Vol I, Red. W.C. Young, blz. 497, Williams and  
Wilkins, Baltimore
- Everett, J.W. 1964 In: Major problems in neuro-endocrino-  
logy, Red. E. Bajusz & G. Jasmin, blz. 346, Karger,  
Bazel
- Everett, J.W. 1967, Endocrinol 80:145
- Everett, J.W. & Sawyer, C.H. 1950, Endocrinol 47:198
- Fawcett, D.W., Susumo, I & Slautterback, D. 1959, J bio-  
phys biochem cytol 5:453
- Franchi, L.L. & Mandl, A.M. 1962, Proc Roy Soc (B) 157:99
- Franchi, L.L., Mandl, A.M. & Zuckerman, S. 1962 In: The  
ovary, Deel I, eds. S. Zuckerman, A.M. Mandl &  
P. Eckstein, blz. 1, Academic Press, London
- Freeman, M.E., Butcher, R.L. & Fugo, N.W. 1968, Biol  
Reprod 2:209
- Fridhandler, L.E., Hafez, S.E. & Pincus, G. 1957, Exp Cell  
Re 13:132
- Fugo, N.W. & Butcher, R.L. 1966, Fert Steril 17:804
- Glass, L.E. 1970, Adv Bio Sci 6:29
- Goldman, A.S., Yakovac, W.C. & Bongiovanni, A.M. 1965,  
Endocrinol 77:1105
- Green, S.H. & Zuckerman, S 1951, J Anat 85:273

- Guerrero, R. & Lanctot, C.A. 1970, *Am J Obst G* 107:263
- Guraya, S.S. 1973, *Ann Biol An* 13 (suppl):229
- Gwatkin, R.B.L. & Haidri, A.A. 1974, *J Repr Fert* 37:127
- Gwatkin, R.B.L., Williams, D.T., Hartmann, J.F. & Kniazuk, M. 1973, *J Repr Fert* 32:259
- Hardisty, M.W. 1967, *Biol Rev* 42:265
- Hargitt, G.T. 1925, *J Morph* 40:517
- Hargitt, G.T. 1930, *J Morph* 49:333
- Hartmann, J.F. & Gwatkin, R.B.L. 1971, *Nature* 234:479
- Hartmann, J.F. & Hutchison, C.F. 1974, *J Repr Fert* 37:443
- Hastings II, R.A., Enders, A.C. & Schlafke, S. 1972, *Biol Reprod* 7:288
- Heck, F. & Mauléon, P. 1969, *Ann Biol An*, geciteerd door P. Mauléon In: *Reproduction of domestic animals*, Red. H.H. Cole & P.T. Cupps, blz. 187, Academic Press, New York
- Hertig, A.T. 1968, *Am J Anat* 122:107
- Hertig, A.T. & Adams, E.C. 1967, *J Cell Biol* 34:647
- Holsinger, J.W. & Everett, J.W. 1972, *Endocrinol* 90:289
- Hope, J. 1965, *J Ultra Res* 12:592
- Hsu, T.G. & Benirschke, K. 1969, *An atlas of mammalian chromosomes*, Springer, Berlijn
- Jaszmann, L. 1973 In: *Ageing and estrogens*, Red. P.A. van Keep & C. Lauritzen, blz. 22, Karger, Bazel
- Jones, E.C. & Krohn, P.L. 1961a, *J Endocr* 21:469
- Jones, E.C. & Krohn, P.L. 1961b, *J Endocr* 21:497
- Jost, A. & Prépin, J. 1966, *Arch Anat M* 55:161
- Kahnt, F.W. & Neher, R. 1966, *Helvet chim a* 49:725
- Krarup, T., Pederson, T. & Faber, M. 1971, *Nature* 224:187
- Labhsetwar, A.P., Joshi, H.S. & Watson, D. 1973, *Biol Reprod* 8:321
- Latta, J.S. & Pederson, E.S. 1944, *Anat Rec* 90:23
- Lipner, H. & Greep, R.O. 1971 *Endocrinol* 88:602
- Lipner, H. & Wendelken, L. 1971, *P Soc Exp M* 136:1141
- Long, J.A. & Evans, H.M. 1922, *Mem Univ Calif* 5:5
- Longo, F.J. 1973, *Biol Reprod* 9:149



- Mandl, A.M. 1963, P Roy Soc B 158:105
- Mandl, A.M. & Zuckerman, S. 1952, J Endocr 8:126
- Mauléon, P. 1967, Arch Anat Microsc Morph Exp (suppl 3-4) 56:125
- Mauléon, P. 1969 In: Reproduction of domestic animals, Red. H.H. Cole & P.T. Cupps, blz. 187, Academic Press, New York
- Mazanec, K. 1965, Arch Biol 76:49
- Mazia, D. 1961 In: The cell, vol. III, Red. J. Brachet & A.E. Mirsky, blz. 77, Academic Press, New York
- McAlpine, R.J. 1955, Anat Rec 121:407
- McKay, D.G., Hertig, A.T., Adams, E.C. & Danziger, S. 1953, Anat Rec 117:201
- Merchant, H. & Chang, M.C. 1971, Anat Rec 171:21
- Merchant, H. & Zamboni, L. 1972 In: The development and maturation of the ovary and its functions, Red. H. Peters, blz. 95, I C S 267, Excerpta Medica, Amsterdam
- Mintz, B. 1959, Anat Rec 134:608
- Mintz, B. 1960, J Cell Phys 56:31
- Mintz, B. & Russell, E.S. 1955, Anat Rec 122:443
- Mintz, B. & Russell, E.S. 1957, J Exp Zool 134:207
- Moll, J. & Zeilmaker, G.H. 1966, Act Endocr 51:281
- Monesi, V. 1972 In: Reproduction in mammals I, Germ cells and Fertilization, Red. C.R. Austin & R.V. Short, blz. 46, University Press, Cambridge
- Neal, P. & Baker, T.G. 1973, J Repr Fert 33:399
- Norrevang, A. 1968, Int Rev Cytol 23:114
- Noyes, R.W. 1970, Ann N Y Acad 171:517
- Oakberg, E.F. 1967, Arch Anat M 56:171 (suppl 3-4)
- Oakberg, E.F. 1968, Mutat Res 6:155
- Odor, D.L. 1955, Am J Anat 97:461
- Odor, D.L. 1960, J Biophys Biochem Cytol 7:567
- Odor, D.L. & Blandau, R.J. 1969a, Am J Anat 124:163
- Odor, D.L. & Blandau, R.J. 1969b, Am J Anat 125:177

- Ohno, S. 1967, Sex chromosomes and sex-linked genes,  
Springer, Berlijn
- Ohno, S. & Smith, J.B. 1964, Cytogenet 3:324
- Oxender, W.D., Hafs, H.D. & Miller, C.C. 1971, Biol  
Reprod 5:319
- Parlow, A.F. 1968 In: Gonadotropins, Red. E. Rosenberg,  
blz. 59, Los Altos, Calif
- Pederson, E.S. 1951, Am J Anat 88:397
- Pederson, T. 1972 In: Oogenesis, Red. J.D. Biggers &  
A.W. Schuetz, blz. 361, University Park Press,  
Baltimore
- Pederson, T. & Peters, H. 1971, Fert Steril 22:42
- Peters, H. 1969, Act Endocr 62:96
- Peters, H. 1971, Phi T Roy B 259:91
- Peters, H., Byskov, A.G. & Faher, M. 1972 In: The develop-  
ment and maturation of the ovary and its functions,  
Red. H. Peters, blz. 20, I C S 267, Excerpta Medica,  
Amsterdam
- Pincus, G. & Enzmann, E.V. 1935, J Exp Med 62:665
- Quinn, D.L. 1966, Nature 209:891
- Quinn, D.L. & Everett, J.W. 1967, Endocrinol 80:155
- Raven, Ch.P. 1961, Oogenesis, the storage of developmental  
information, Pergamon, Oxford
- Reynhout, J. & Smith, L.D. 1973, Develop Biol 30:392
- Rhoades, M.M. 1961 In: The cell, vol. III, Red. J. Brachet  
& A.E. Mirsky, blz. 1, Academic Press, New York
- Rodman, T.C. 1971, Nature 223:191
- Rondell, P. 1964, Am J Phys 207:590
- Rondell, P. 1970, Fed Proc 29:1875
- Rondell, P. 1974, Biol Reprod 10:199
- Schwartz, N.B. & McCormack, C.E. 1972, Annual Review of  
Physiol, 245
- Schuetz, A.W. 1974, Biol Reprod 10:150
- Shaikh, A.A. & Harper, M.J.K. 1972, Biol Reprod 7:387
- Shapiro, H.A. 1936, Chem Ind London 55:1031

- Sotelo, J.R. & Porter, K.R. 1959, *J Biophys Biochem Cytol* 5:327
- Stieve, H. 1927, *Z Zell Mikr* 10:225
- Swezy, O. 1929, *J Morph* 48:445
- Szollosi, D. 1965, *Anat Rec* 151:424
- Szollosi, D. 1967, *Anat Rec* 159:431
- Szollosi, D. 1969, *J Cell Biol* 43:143a
- Szollosi, D., Calarco, P. & Donahue, R.P. 1972, *J Cell Sci* 11:521
- Tarkowski, A.K., Witkowska, A. & Nowicka, J. 1970, *Nature* 226:162
- Taylor, M.J. & Short, R.V. 1973, *J Repr Fert* 32:441
- Thibault, Ch. 1949, *Ann Sc Nat Zool* 11:133
- Thibault, Ch. 1972 In: *Oogenesis*, Red. J.D. Biggers & A.W. Schuetz, blz. 397, University Park Press, Baltimore
- Thibault, Ch. 1973 In: *Regulation of Mammalian Reproduction*, Red. S.J. Segal, R. Crozeer & P.A. Corfman, blz. 231, C.C. Thomas, Springfield, Illinois
- Tsafriri, A. & Lindner, H.R., Zor, U. & Lamprecht, S.A. 1972, *J Reprod Fert* 31:39
- Tsafriri, A. & Kraicer, P.F. 1972, *J Repr Fert* 29:387
- Tsafriri, A., Lieberman, M.E., Barnea, A., Bauminger, S. & Lindner, H.R. 1973, *Endocrinol* 93:1378
- Tsuda, H. 1965, *Arch Hist Jap* 25:533
- Turgeon, J. & Barraclough, C.A. 1973, *Endocrinol* 92:755
- Uilenbroek, J.Th.J. 1974, *Academisch proefschrift Erasmus Universiteit Rotterdam*
- Vermeiden, J.P.W. & Zeilmaker, G.H. 1974, *Endocrinol* 95:341
- Vincent, W.S. & Dornfield, E.J. 1948, *Am J Anat* 83:437
- Weakley, B.S. 1966, *J Anat* 100:503
- Weakley, B.S. 1967, *J Anat* 101:435
- Weakley, B.S. 1968, *Z Zell Mikr* 85:109
- Welschen, R.W. 1972, *Academisch proefschrift Erasmus Universiteit Rotterdam*
- Wischnitzer, S. 1967, *J Morph* 121:29
- Witschi, E. 1948, *Contr Embryol Carneg Inst* 32:67

- Young, W.C. 1961 In: Sex and internal secretion, Red.  
W.C. Young, blz. 449, Williams & Wilkins Co,  
Baltimore
- Zamboni, L. 1972 In: Oogenesis, Red. J.D. Biggers &  
A.W. Schuetz, blz. 5, University Park Press,  
Baltimore
- Zamboni, L. 1974, Biol Reprod 10:125
- Zamboni, L. & Mastroianni, L. 1966, J Ultra Res 14:95
- Zeilmaker, G.H., Hülsmann, W.C., Wensinck, F. & Verhamme,  
C. 1972, J Repr Fert 29:151
- Zeilmaker, G.H. & Verhamme, C. 1974, Biol Reprod (in press)
- Zuckerman, S. 1951, Rec Progr Horm Res 6:63
- Zwarenstein, H. 1937, Nature 139:112

## CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 7 juni 1945 te Utrecht geboren. Het gedeelte van zijn jeugd dat hij zich herinneren kan speelde zich echter te Rotterdam af. Te Rotterdam werd de lagere school, de Mulo en de HBS doorlopen. In 1964 begon hij met de biologiestudie aan de Vrije Universiteit. Het kandidaats-examen werd in 1967 afgelegd. Het praktische werk van het doctoraalexamen werd onder leiding van Prof. Dr. J. Joosse (vergelijkende endocrinologie) en Dr. T.A. de Vlieger (zintuigfysiologie) verricht. Het doctoraal-examen werd in 1971 afgelegd. Vanaf maart 1971 is hij werkzaam geweest op de afdeling Endocrinologie, Groei en Voortplanting van de Erasmus Universiteit.

Dank je, lieve Wieke