

## DE BOVIENE OVARIËLE FOLLICULAIRE DYNAMIEK DEEL II: ANTRALE ONTWIKKELING, EXOGENE BEÏNVLOEDING EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

J.M.J. Aerts, P.E.J. Bols

Laboratorium voor de Fysiologie van de Huisdieren, Universiteit Antwerpen,  
Departement Diergeneeskunde, Universiteitsplein 1, Gebouw U, B-2610 Wilrijk  
jan.aerts@ua.ac.be

### SAMENVATTING

De oestrische cyclus behelst de ontwikkeling van een cohorte antrale follikels tot - naargelang de diersoort - één of meerdere ovulatoire follikels. Tijdens de boviene oestrische cyclus ontstaan gemiddeld twee tot drie dergelijke cohorten of groeigolven, waarvan enkel de laatste aanleiding zal geven tot een ovulatie.

In elke groeigolf worden meerdere antrale follikels gerecruteerd voor ontwikkeling. Na de recrutering ondergaan de antrale follikels een selectieproces, waarbij steeds lagere Follikel Stimulerend Hormoon (FSH)-concentraties ter beschikking komen voor de FSH-afhankelijke follikels. Bij het rund zal per cohorte slechts één follikel uitgroeien tot een dominante follikel (DF). Het vermogen van de DF om zich te ontwikkelen bij basale FSH-concentraties wordt toegeschreven aan een verschuiving in gonadotropine-afhankelijkheid van FSH naar Luteïniserend Hormoon (LH). Het exacte mechanisme van follikelselectie is evenwel nog steeds niet opgelost.

In dit artikel wordt uitgebreid aandacht besteed aan de recrutering-, selectie- en dominantiefase van de antrale ontwikkeling. Vervolgens wordt dieper ingegaan op de voorwaarden die leiden tot maturatie en ovulatie van de follikel. In een afzonderlijk hoofdstuk wordt de exogene beïnvloeding van de folliculaire dynamiek met het oog op superovulatie/superstimulatie besproken. Tenslotte worden enkele mogelijkheden voor toekomstig onderzoek geschetst.

### INLEIDING

Door de introductie van de echografie in de diergeneeskunde werd het mogelijk om de groei van follikels met een diameter  $\geq 2$  mm dagelijks op te volgen. Mede hierdoor is duidelijk aangetoond dat de ontwikkeling van antrale follikels tijdens de oestrische cyclus bij het rund, het schaap, de geit, het paard en ook bij de mens, verloopt volgens een golvenpatroon. Boviene cycli vertonen meestal twee tot drie dergelijke ontwikkelingsgolven, waarvan enkel de laatste tot een ovulatie leidt.

Groeigolven komen voor tijdens de oestrische cyclus, maar worden ook waargenomen bij prepuberale kalveren (Evans *et al.*, 1994), tijdens de dracht (Ginther *et al.*, 1989), in de postpartumperiode en tijdens de lactatie (Savio *et al.*, 1990) en in perioden van anoestrus (Bossis *et al.*, 2000).

De groei van de follikel tijdens de oestrische cyclus volgt chronologisch op de pre-antrale ontwikkeling. Nochtans zal niet elke antrale follikel zich verder ontwikkelen tijdens de oestrische cyclus. Het merendeel der antrale follikels ondergaat immers atresie. Slechts

in aanwezigheid van follikel stimulerend hormoon kan een follikel ontsnappen aan apoptosis en opgenomen worden in een cohorte groeiende follikels. Van de ovariële reserve aan primordiale follikels die tijdens de fetale periode werd aangemaakt, gaat uiteindelijk meer dan 99,9% verloren (Erickson, 1966a; 1966b).

Ook de tijd die nodig is voor de pre-antrale, respectievelijk antrale ontwikkeling van de follikel, is sterk verschillend. De totale duur van de ontwikkeling van primordiale tot ovulatoire follikel bij het rund wordt geschat op 180 dagen (Lussier *et al.*, 1987). De groei vanaf het begin van het antrale stadium tot ovulatoire follikel zou daarvan gemiddeld 42 dagen in beslag nemen (Lussier *et al.*, 1987). Het grootste gedeelte van de ontwikkelingstijd wordt zodoende besteed aan de pre-antrale fasen. Ter vergelijking: de gemiddelde totale ontwikkelingsduur van follikels wordt geschat op 20 dagen bij de muis (Pedersen, 1970), op 184 dagen bij het schaap (Lundy *et al.*, 1999) en op 205 dagen bij de mens (Gougeon, 1996).

**Tabel 1. Gemiddelde duur van de boviene folliculaire groeigolven (naar Noseir, 2003). (dagen, gemiddelde  $\pm$  SEM).**

| Groeigolf | 2-golvenpatroon | 3-golvenpatroon |
|-----------|-----------------|-----------------|
| 1ste      | 8,7 $\pm$ 0,3   | 7,2 $\pm$ 0,7   |
| 2de       | 10,8 $\pm$ 0,3  | 7,7 $\pm$ 0,4   |
| 3de       | -               | 9,5 $\pm$ 0,4   |

## FOLLICULAIRE ONTWIKKELING TIJDENS DE OESTRISCHE CYCLUS

### Golvenpatroon

De folliculaire ontwikkeling tijdens de oestriscie cyclis verloopt bij de meeste huisdieren (rund, buffel, schaap, geit, paard) en bij de mens in golven (Evans, 2003). De boviene cyclis vertoont meestal twee tot drie golven, alhoewel cycli met vier golven of met slechts één golf ook kunnen voorkomen (De Rensis en Peters, 1999). Korte cycli met slechts één groeigolf zouden voornamelijk post partum (Savio *et al.*, 1990) en tijdens de puberteit (Evans *et al.*, 1994) optreden. De eerste groeigolf ontstaat op de dag van ovulatie (D0), de volgende golf op dag 9 à 10 voor een twee-golvenpatroon, of op dag 8 à 9 en 15 à 16 voor een drie-golvenpatroon (De Rensis en Peters, 1999; Mapletoft *et al.*, 2002). Groeigolven komen zodoende voor tijdens zowel de folliculaire als de luteale fase van de oestriscie cyclis. In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de gemiddelde duur van de groeigolven naargelang het golvenpatroon.

Bij koeien met een twee-golvenpatroon is de tweede DF ovulatoir, bij koeien met een drie-golvenpatroon de derde. Bij schapen en geiten daarentegen kunnen - zij het uitzonderlijk - dubbele ovulaties voorkomen, waarbij de DF uit de voorlaatste groeigolf eveneens ovuleert (Ginther en Kot, 1994; Bartlewski *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 1999). Boviene oestriscie cycli met twee groeigolven duren gemiddeld 21 dagen, cycli met drie golven gemiddeld 23 dagen (Pierson en Ginther, 1987; Sirois en Fortune, 1988). Er zijn aanwijzingen dat een eicel die ovuleert in een drie-golvenpatroon fertiel is dan een eicel die ovuleert in een twee-golvenpatroon, omdat deze laatste follikels groter, maar vooral ook ouder

zijn (Townson *et al.*, 2002). In figuur 1 wordt de ontwikkeling in een drie-golvenpatroon grafisch weergegeven.

### Recrutering

Elke groeigolf kan ingedeeld worden in een recruterings-, selectie- en dominantiefase (Figuur 2). Tijdens de recruteringsfase ontsnapt een cohorte antrale follikels aan apoptosie onder invloed van verhoogde niveaus circulerend FSH. Een cohorte bestaat bij het rund gemiddeld uit 5 tot 10 follikels (Driancourt, 2001), maar kan tot 24 follikels omvatten (Mihm en Austin, 2002). Regressie van de DF tijdens groeigolven, of ovulatie op het einde van een oestriscie periode, veroorzaakt een tijdelijke verhoging van het circulerend FSH. De teloorgang van de DF gaat immers gepaard met een verminderde perifere concentratie van de door de follikel gesynthetiseerde hormonen oestrogenen en inhibine, waardoor de remming van FSH-vrijstelling uit de hypofyse tijdelijk wegvalt. FSH fungeert als overlevingsfactor voor vroege antrale follikels, het stadium waarin de meeste follikels onder fysiologische condities atresie ondergaan (Chun *et al.*, 1996). Het is daardoor verantwoordelijk voor de recrutering van een nieuwe cohorte follikels voor de volgende groeifase.

### Selectie

Tijdens elke oestriscie groeigolf ondergaan de gerecruteerde follikels een selectieproces, waarbij - bij mono-ovulatoire species, zoals rund en paard, - meestal slechts één follikel uitgroeit tot een DF terwijl de andere follikels regresseren (Ginther, 2000). De FSH-piek die verantwoordelijk is voor het ontstaan van een folliculaire groeigolf, bereikt een maximale waarde wanneer de grootste follikels een diameter van 4 à 5 mm hebben bereikt, waarna de FSH-concentratie afneemt (Kulick *et al.*, 1999). Voor de eerste groeigolf van de cyclis wordt deze maximale FSH-concentratie ca. 28u na het begin van de oestriscie cyclis bereikt (Mihm en Austin, 2002). De groeiende follikels onderdrukken door productie en vrijstelling van oestradiol en inhibine de FSH-secretie, niettegenstaande deze follikels voor hun verdere ontwikkeling zelf nog behoefte hebben aan FSH. Experimenteel kon worden aangetoond dat follikels met 3 mm-diameter FSH nog niet onderdrukken, maar dit vermogen verwerven wanneer ze een diameter van 5 mm hebben bereikt (Gibbons *et al.*, 1999).

## Dominantie

Wanneer de grootste follikel na een groeiperiode van ongeveer drie dagen een gemiddelde diameter van 8,5 mm heeft bereikt, ontstaat een scheiding tussen de toekomstige DF en de overige ondergeschikte follikels. Dit keerpunt wordt door Ginther en medewerkers "deviatie" genoemd (Ginther *et al.*, 1997; 1998; 1999; Kulick *et al.*, 1999). Vóór de deviatie behouden alle ontwikkelende follikels het vermogen om zelf DF te worden. Na de deviatie groeit de grootste follikel uit tot DF en ondergaan de andere follikels regressie. In een experimentele opzet bij vaarzen kon aangetoond worden dat alle follikels potentieel in staat zijn tot ovulatie, door een willekeurig gekozen follikel met een diameter van 5 mm te laten uitgroeien tot DF en de andere 5 mm-follikels te vernietigen (Gibbons *et al.*, 1997). In een ander experiment kon door ablatie van de grootste follikel net vóór het tijdstip van deviatie de tweede grootste follikel uitgroeien tot DF (Ginther *et al.*, 1999).

De DF wordt de belangrijkste inhibitor van de FSH-secretie, maar slaagt er, niettegenstaande de basale FSH-concentraties, toch in om zelf te blijven groeien. Deze lage FSH-concentraties voorkomen het ontstaan van een nieuwe cohorte groeiende follikels. Aanvankelijk ging men er vanuit dat de scheiding tussen DF en ondergeschikte follikels zeer geleidelijk tot stand komt en reeds begint bij het ontstaan van de cohorte groeiende follikels. Onderzoek heeft evenwel uitgewezen dat het vaak een zeer abrupt proces is (Ginther *et al.*, 1997) waarbij de DF in een kritische periode van 8 uur rond het tijdstip van deviatie, door onderdrukking van FSH, atresie veroorzaakt van de overige grote follikels (Ginther *et al.* 2000).

De relatie tussen FSH en de aanwezige follikels wordt door Ginther *et al.* (2000; 2001) beschreven als een functionele koppeling. Tijdens de selectiefase bestaat een multipole follikel-FSH-koppeling, waarbij de groeiende follikels FSH-secretie onderdrukken door de productie van oestradiol en inhibine, terwijl ze voor hun eigen ontwikkeling nog afhankelijk zijn van dit FSH. Bij het begin van de deviatie verandert de relatie naar een 'single' follikel-FSH-koppeling, waarbij enkel de toekomstige DF kan overleven op basis van de lage FSH-concentraties. Over het mechanisme van selectie en deviatie bestaat nog geen uitsluitend. Mihm en Austin (2002) stellen hypothetisch dat de DF beter gebruik kan maken van het endocriene en ovariële milieu door optimale benutting van FSH en FSH-afhankelijke groeifactoren. Volgens andere

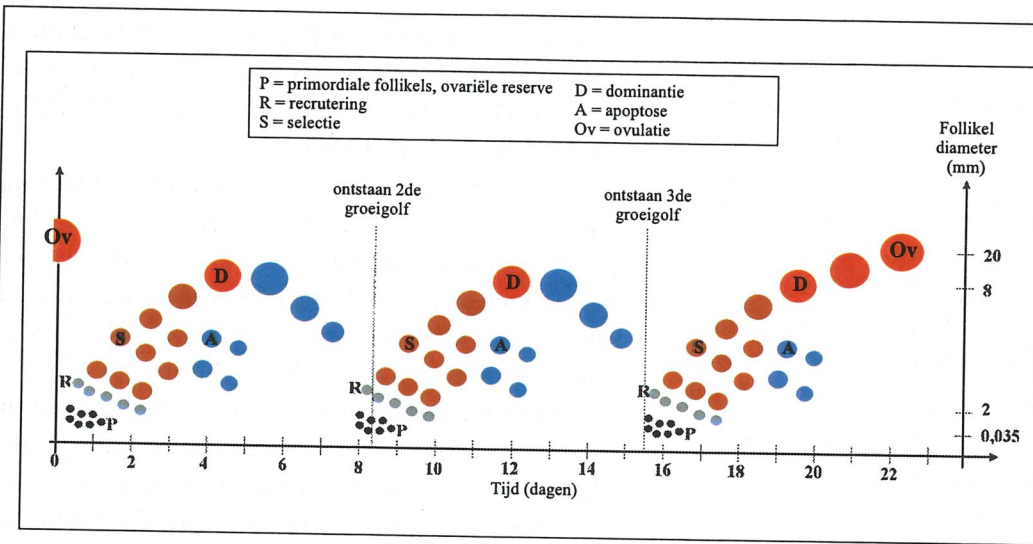
onderzoekers heeft de toekomstige DF gedurende de ganse groeigolf een groeivoorsprong op de latere ondergeschikte follikels (Ginther *et al.*, 1997; 2000; 2001; Kulick *et al.*, 1999).

Algemeen wordt aangenomen dat LH het sleutelhormoon is tijdens de dominantiefase. Ginther *et al.* (2001) toonden aan dat LH-receptoren bij vaarzen verschijnen in de granulosa-cellen van de toekomstige DF, 8 uur vóór het begin van de deviatie. Meer algemeen ontstaan deze LH-receptoren bij het rund vanaf een folliculaire diameter van 8 mm. Er zou bij de DF een verschuiving optreden in gonadotropine-afhankelijkheid van FSH naar LH, waardoor de DF, niettegenstaande de lage circulerende FSH-concentraties, toch in staat is te overleven en te matureren. In menig experiment kon de sleutelrol van LH tijdens de dominantie worden aangetoond. Zo was het bijvoorbeeld noodzakelijk om exogeen LH toe te dienen aan gonadotropine-releasing hormoon (GnRH)-geïmmuniseerde vaarzen opdat follikels van 8 mm konden uitgroeien tot een ovulatoire diameter (Crowe *et al.*, 2001).

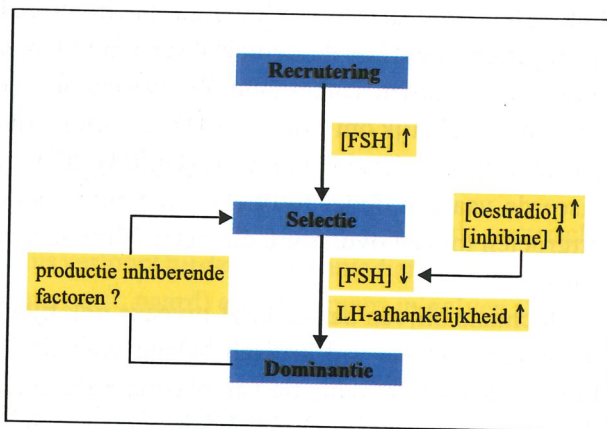
Nochtans blijven basale FSH-niveaus ook tijdens de dominantiefase van kritisch belang voor de DF. Een experimentele reductie van plasma FSH tijdens de dominantiefase leidde bij koeien tot een groei-stilstand van de DF, bij andere diersoorten zelfs tot regressie (Turzillo en Fortune, 1993).

Tijdens de dominantie ondergaat de follikel functionele veranderingen die hem voorbereiden op ovulatie. Zo secreteert de follikel geleidelijk aan steeds meer oestradiol. Het feedbackeffect van oestradiol op de gonadotropinesecretie is functie van een drempelwaarde: bij plasma oestradiolconcentraties beneden deze drempelwaarde oefent oestradiol een negatieve feedback uit, boven de drempelwaarde een positieve feedback (Bouchard *et al.*, 1988; Svensson, 2000; Wiltbank *et al.*, 2002). Progesteron oefent een inhiberende werking uit op de gonadotropinesecretie. (Ireland en Roche, 1982; Bouchard *et al.*, 1988; Bergfeld *et al.*, 1996). Snellere GnRH-pulsfrequenties bevorderen LH-vrijstelling, tragere GnRH-pulsen bevorderen FSH-vrijstelling (Wildt *et al.*, 1981) (Figuur 3). Toenemende perifere oestradiolconcentraties zullen zodoende een stimulerend effect uitoefenen op de GnRH-pulsfrequentie, waardoor de LH-secretie wordt bevorderd. In afwezigheid van een corpus luteum zal dit leiden tot een LH-piek, die ovulatie en luteïnisatie induceert.

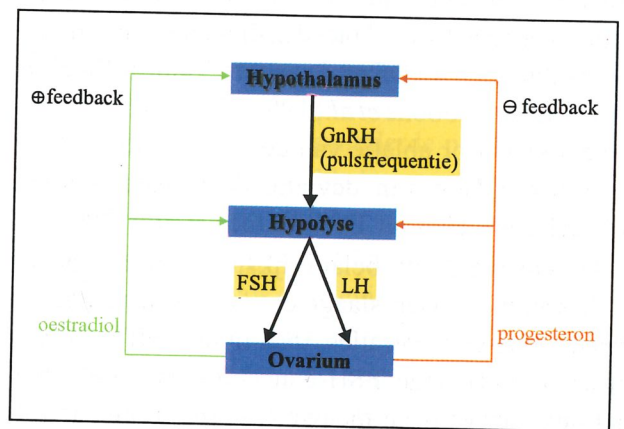
Omgekeerd wordt de folliculaire oestradiol-synthese ook beïnvloed door zowel LH als FSH. Luteïniserend hormoon stimuleert de androgeenpro-



**Figuur 1.** Recrutering, selectie en dominantie volgens een drie-golvenpatroon tijdens een bovine oestrische cyclus.

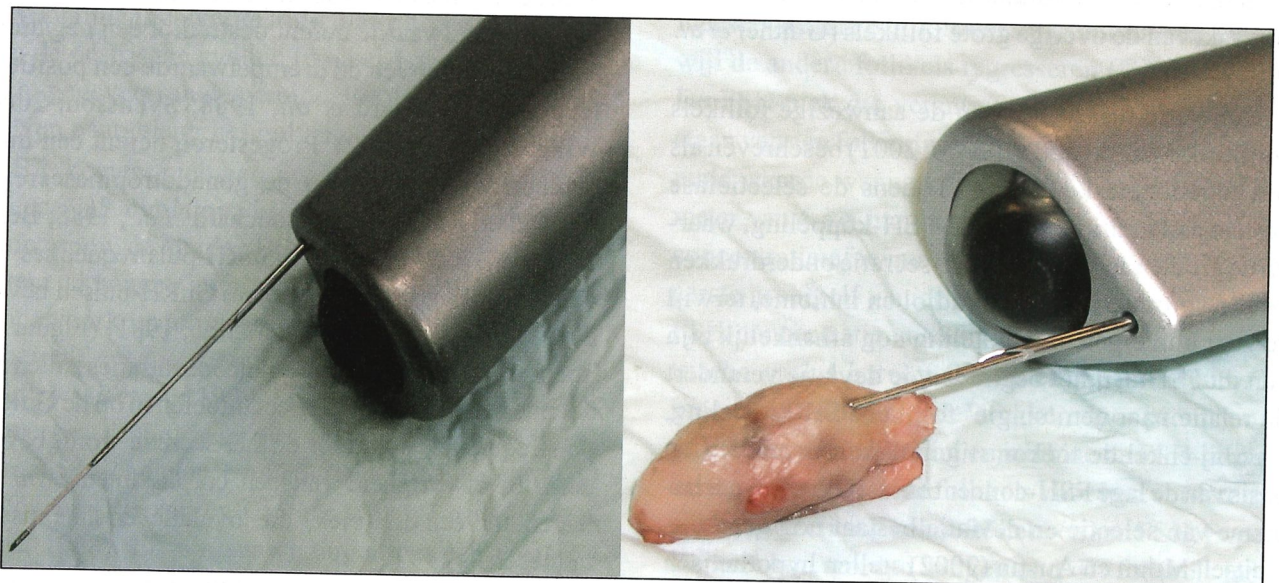


**Figuur 2.** Ontwikkeling van dominantie (naar Armstrong en Webb, 1997).



**Figuur 3.** Feedbackmechanisme van oestradiol en progesteron.

Vanaf een bepaalde drempelwaarde zal oestradiol door een positief feedbackmechanisme de GnRH-pulsfrequentie versnellen, waardoor LH-secretie wordt bevorderd. Progesteron remt door negatieve feedback de pulsfrequentie, waardoor in aanwezigheid van een corpus luteum geen LH-piek ontstaat.



**Figuur 4.** OPU-toestel aangepast voor transvaginale echogeleide biopsienname van het ovarium (Aerts *et al.*, 2004).

ductie door thecacellen. Deze androgenen worden vervolgens gearomatiseerd tot oestradiol door aromatische dat onder invloed van FSH in granulosa-cellen tot expressie wordt gebracht (Fortune, 1994). De oestradiolproductie lijkt echter geen rol te spelen in het selectiemechanisme, maar varieert sterk in functie van de fysiologische status van de koe. Lage oestradiolconcentraties ontstaan in follikels die zich post partum ontwikkelen, beperkte concentraties in follikels tijdens de eerste groeigolf en hoge concentraties in follikels die tijdens de folliculaire fase van de oestrische cyclus tot ontwikkeling komen (Driancourt, 2001).

#### MATURATIE, FUNCTIE VAN HET CORPUS LUTEUM EN OVULATIE

Bij de mammalia blijken vooral de pre-ovulatoire LH-pulsen belangrijk te zijn voor de maturatie van de follikel. Luteïniserend hormoon stimuleert de ruptuur van de volgroeide follikel, mogelijk door een verhoogde folliculaire biosynthese van het prostaglandine E<sub>2</sub> (Tsafiri *et al.*, 1972). Onder invloed van LH zouden de granulosa-cellen en thecacellen voorbereid worden op luteïnisering (Smith *et al.*, 1994). Cumuluscellen gaan over tot de synthese van hyaluronzuur dat, wanneer het hydrateert, de ruimte tussen de granulosa-cellen vergroot en zo instaat voor het proces van cumulusexpansie (Eppig, 2001). Episodische LH-pulsen zijn noodzakelijk voor de ontwikkeling van het corpus luteum (CL) bij het rund, maar niet om de luteale functie te onderhouden. Wanneer LH-pulsen werden geblokkeerd door toediening van een GnRH-antagonist op dag 2 tot 7 van de cyclus of op dag 7 tot 12 van de cyclus, werd de luteale functie onderdrukt. De toediening van de GnRH-antagonist op dag 12 tot 17 van de cyclus had echter geen nadelig effect op de werking van het CL (Peters *et al.*, 1994).

Gedurende de bovine oestrische cyclus fluctueert de LH-pulsfrequentie als volgt: 9 tot 16 pulsen per 24 uur tijdens de vroeg luteale fase; 6 pulsen per 24 uur tijdens de mid-luteale fase; 14 tot 24 pulsen per 24 uur tijdens de folliculaire fase (Cupp *et al.*, 1995; Ginther *et al.*, 1998; Mihm en Austin, 2002). Wanneer de eerste DF van de cyclus verschijnt, is het CL meestal nog actief. Dit CL zal door zijn progesteronsecretie de LH-pulsfrequentie nadelig beïnvloeden, wat zich vertaalt in een lagere puls-frequentie tijdens de mid-luteale fase en atresie van de LH-afhankelijke DF. Indien luteolysis optreedt tijdens de dominantiefase

van de tweede DF, zal deze follikel ovuleren. Als het CL echter nog actief is, zal door progesteronsecretie en de daaruit volgende LH-suppressie de tweede DF eveneens regresseren. Enkel tijdens de folliculaire fase zal de DF door de toenemende LH-pulsen kunnen matureren en tenslotte ovuleren (Mihm *et al.*, 2002).

#### EXOGENE BEÏNVLOEDING VAN DE FOLLICULAIRE DYNAMIEK VOOR SUPEROVULATIE/SUPERSTIMULATIE

Teneinde de fysiologische beperkingen van één ovulatie per bovine oestrische cyclus te omzeilen, kan de folliculaire dynamiek door middel van exogene toediening van gonadotropinen worden beïnvloed. Het meest typisch gebeurt dit in het kader van embryotransfers, waarbij volgens een specifiek gonadotropineprotocol meerdere ovulaties bij de donor-koe worden geïnduceerd. Na deze 'superovulatie' wordt de koe geïnsemineerd; zeven dagen later worden de embryo's uit de baarmoeder gespoeld, om vervolgens getransplanteerd te worden naar gesynchroniseerde receptorkoeien.

Sedert de ontwikkeling van de transvaginale echografischgeleide ovum pick-up (OPU) (Bols *et al.*, 1994), is ovulatie geen strikte vereiste meer van exogene beïnvloedingsprotocollen. Bij OPU worden de follikels immers gepuncteerd op het ovarium nog vóór ze geovuleerd zijn. De term superovulatie wordt dan ook meer en meer vervangen door 'superstimulatie', waarbij de nadruk ligt op het ontstaan van meerdere DF's per cohorte en op het feit dat deze cohorte niet noodzakelijk de cohorte dient te zijn waaruit onder fysiologische omstandigheden de ovulatoire follikel ontstaat.

Drie verschillende soorten gonadotropinen worden gebruikt voor exogene beïnvloeding van de folliculaire dynamiek (Mapletoft *et al.*, 2002): 1. hypofyse-extracten afkomstig van varkens of andere huisdieren, 2. equine chorionic gonadotrophin (eCG), en 3. human menopausal gonadotrophin (hMG). Deze exogene gonadotropinen verschillen aanzienlijk van elkaar in de verhouding FSH/LH-activiteit en in halfwaardetijd.

De FSH/LH-activiteit van hypofysaire extracten varieert sterk naargelang het gebruikte commerciële preparaat en naargelang het productielot. De halfwaardetijd van FSH bij het rund wordt geschat op  $\leq 5$ u (Monniaux *et al.*, 1983). De FSH-halfwaardetijd schommelt in functie van de glycosileringsgraad, waarbij de

zure isohormonen een tragere clearance kennen dan de minder zure vormen (Padmanabhan *et al.*, 1998). Equine chorionic gonadotrophin, vroeger bekend als pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG), is een complex glycoproteïne met zowel FSH- als LH-werking (Murphy en Martinuk, 1991). Het heeft een uitzonderlijke lange halfwaardetijd van ca. 40 uur bij het rund (Dieleman *et al.*, 1993). In de humane gynaecologie wordt hMG veel toegepast ter behandeling van infertiliteit. Het heeft een sterk FSH- en een zwak LH-effect (Mori, 1994). Het eerste rapport over het gebruik van hMG in de bovine superovulatie dateert van 1982 (Lauria *et al.*). Human chorionic gonadotropin (hCG) tenslotte, wordt eveneens gebruikt in superovulatieprocedures, maar voornamelijk als additief vanwege de uitgesproken LH-activiteit. In commerciële hMG-preparaten bijvoorbeeld, is tot 25% van de LH-activiteit afkomstig van toegevoegd hCG (Ludwig *et al.*, 2003).

Voor elk van deze gonadotropinen bestaan specifieke stimulatieprotocollen die functie zijn van de eigenschappen van de gebruikte producten. Bij superovulatie is het gebruikelijk om prostaglandine F<sub>2α</sub> te injecteren 48 uur tot 72 uur na aanvang van de stimulering, teneinde luteolyse te induceren en een voorspelbare ovulatie en oestrus te bekomen. Vanwege de vrij korte halfwaardetijd van FSH worden hypofysaire extracten tweemaal per dag toegediend, meestal gedurende drie à vier dagen. Er bestaan regimes met constante dosis of met afbouwende doses. Door de zeer lange halfwaardetijd van eCG volstaat één enkele injectie meestal voor superstimulatie. De langdurige aanwezigheid van eCG in de circulatie kan aanleiding geven tot hyperstimulatie van het ovarium, met anovulatie en abnormale endocriene profielen tot gevolg (Mikel-Jenson, 1982; Moor *et al.*, 1984). Door toediening van antistoffen tegen eCG (anti-PMSG) op het tijdstip van inseminatie, kan deze hyperstimulatie worden voorkomen (Dieleman *et al.*, 1993).

De resultaten van superstimulatie variëren sterk van het ene dier tot het andere. In een studie van 2048 donorkoeien bijvoorbeeld, werd 70% van de embryo's gecollecteerd bij slechts 30% van de donoren (Looney, 1986). Superstimulatie wordt daarom ook beschouwd als een belangrijke limiterende factor in de geassisteerde reproductietechnieken (Armstrong, 1993; Gong, 2002). In de conventionele superovulatieprotocollen begon de stimulering halfweg de cyclus (D7 tot D11) (Bo *et al.*, 2002). Proefondervindelijk was vastgesteld dat deze benadering resulteerde in het grootste aantal ovulaties. Sederit de introductie van de

echografie heeft men kunnen nagaan dat deze periode samenvalt met het begin van de tweede folliculaire groeigolf, en dit zowel in een twee- als in een drie-golven ontwikkelingspatroon.

Een zeer belangrijke variabele in de superstimulatierepons is de populatie gonadotropinegevoelige follikels die bij de aanvang van de stimulatie aanwezig zijn op het ovarium (Gong, 2002; Kanitz *et al.*, 2002; Mapletoft *et al.*, 2002). Om de superstimulatierepons te maximaliseren kan door manipulatie van de DF (verwijderen van de DF) of door hormonale 'priming', het aantal antrale follikels aanwezig bij de aanvang van de stimulatie worden vergroot.

Aangezien de DF oestradiol en inhibine secreteert, die de groei van de andere follikels van de cohorte onderdrukken, beïnvloedt de aanwezigheid van een DF de superstimulatierepons nadelig. Bij het verwijderen van de DF zullen door middel van het OPU-toestel alle follikels  $\geq 5$  mm gepuncteerd worden, waardoor gemiddeld 1,5 dagen later (Bo *et al.*, 1995) een nieuwe groeigolf van jonge, gonadotropinegevoelige, antrale follikels ontstaat. Op dezelfde wijze is een voorbehandeling met gonadotropinen (Rieger *et al.*, 1988) of groeihormoon (Bols *et al.*, 1998; Gong, 2002) erop gericht de populatie antrale follikels bij aanvang van het superstimulatieprotocol te vergroten.

Ook de aanwezigheid van LH-activiteit in de meeste gonadotropinen heeft een nadelige invloed op de superovulatierepons. Alhoewel LH noodzakelijk is voor de maturatie en ovulatie van follikels, veroorzaken LH-concentraties boven een bepaalde drempelwaarde vermoedelijk luteïnisering van de follikels en premature ovulaties (Herrler *et al.*, 1991). De embryokwaliteit zou bovendien lijden onder te hoge LH-concentraties wegens vroegtijdige activering van de oöcyt (Moor *et al.*, 1984). Experimenten met gezuiverde FSH-preparaten of met recombinant FSH (rFSH) tonen aan dat superstimulatie in afwezigheid van exogene LH-activiteit mogelijk is en de superstimulatierepons zelfs bevordert (Chupin *et al.*, 1984; Looney *et al.*, 1988). Voor wat betreft superovulatie zijn de rapporten minder duidelijk over het vermogen van LH-vrije gonadotropinen om ovulatie te induceren. Takagi en medewerkers (2001) plaatsten twee groepen vaarzen onder identieke stimulatieprotocollen met enerzijds rFSH en anderzijds eCG. In beide groepen ontstonden vergelijkbare aantallen follikels  $> 8$  mm. Multipole ovulaties ontstonden echter bij slechts drie van de zes met rFSH behandelde

dieren, maar wel bij vier van de vier met eCG behandelde dieren.

## TOEKOMSTIG ONDERZOEK

De toenemende kennis met betrekking tot de pre-antrale en antrale folliculaire dynamiek opent mogelijkheden voor toekomstig onderzoek. De maximalisering van de mechanismen die gameten ter beschikking stellen van de reproductie, zowel *in vivo* als *in vitro*, zal hierbij het belangrijkste doel zijn. Enerzijds zal het onderzoek zich toespitsen op de *in vitro* cultuur van pre-antrale follikels. Midden de jaren negentig werd hieromtrent reeds waardevol werk verricht door Figueiredo *et al.* (1993), die een methode op punt stelden om primordiale follikels via mechanische en enzymatische technieken te isoleren uit bovine ovaria. Eén van de bijkomende moeilijkheden in dit onderzoek bleek het behoud van de folliculaire integriteit tijdens de *in vitro* kweek. Door suboptimale kweekcondities was het niet mogelijk om de follikels gedurende langere tijd *in vitro* in cultuur te houden. De grootte die follikels *in vitro* kunnen bereiken, is immers gelimiteerd door fysische beperkingen, zoals perfusiegradiënten (Hartshorne, 1997). Bij onze grote huisdieren is de groei van grote pre-antrale en antrale follikels daardoor beperkt. Ook de cultuur van populaties kleine pre-antrale follikels is aan beperkingen onderworpen, onder andere wegens de ontbrekende kennis van de mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de initiëring van de groei van primordiale follikels (Aerts en Bols, 2004, gepubliceerd elders in deze uitgave). Niettegenstaande werden reeds cultuursystemen voor geactiveerde bovine pre-antrale follikels op punt gesteld, die toelaten onder gecontroleerde omstandigheden de invloed van diverse mediators op de follikelgroei te onderzoeken. Dit werd bijvoorbeeld nagegaan door Gutierrez *et al.* (2000), die erin slaagden om bovine pre-antrale follikels met een gemiddelde diameter van 166  $\mu\text{m}$  gedurende 28 dagen in cultuur te houden en zo het effect van FSH, insulin-like growth factor I en epidermale groeifactor te onderzoeken.

Aangezien de zeer lange groei- en rijpingsfase van primordiale tot antrale follikels bij de grotere huisdieren in de proefbuis haast niet te overbruggen is, blijft het van belang om het levende dier als model niet te vergeten. Daarom zal het onderzoek zich anderzijds moeten toespitsen op alternatieve stimulatietherapieën en stimulatieschema's die bij het levende dier meer gameten beschikbaar maken voor de repro-

ductie. Een eerste mogelijkheid is het toedienen van exogene hormonen (bijvoorbeeld FSH-LH) rechtstreeks op de plaats van inwerking, met name intraovarieel (Bols *et al.*, 2004), via een transvaginale injectie onder echografische controle. Hiertoe werd binnen onze onderzoeksgroep reeds een aantal experimenten verricht, waaruit blijkt dat het intraovarieel toedienen van een bepaalde substantie perfect mogelijk is. De intraovariële toediening van een (ten opzichte van traditionele superstimulatieprotocollen) lage dosis FSH-LH induceerde de groei van gemiddeld  $5,5 \pm 4,2$  follikels met een diameter van meer dan 5 mm bij de behandelde dieren. Deze methode kan uiteraard ook gebruikt worden om andere lokale mediators of combinaties daarvan (eCG, insulin-like growth factor I, groeihormoon, ...) toe te dienen.

Het uiteindelijke doel is het verhogen van het aantal follikels dat in aanmerking komt voor de echografischgeleide transvaginale punctie, zodat meer eicellen kunnen worden geaspireerd en ter beschikking komen voor de *in vitro* productie van embryo's.

Anderzijds kan de collectietechniek zich ook toespitsen op het verzamelen van primordiale follikels op een herhaalbare basis bij levende donoren, in de hoop dat er op korte termijn *in vitro* kweekmethoden beschikbaar worden. Een mogelijke methode is de transvaginale echogeleide ovariële biopsienamname (Aerts *et al.*, 2004). Hierbij wordt met behulp van de klassieke OPU-apparatuur een monster genomen van de ovariële cortex (Figuur 4), waaruit dan in de toekomst mogelijk primordiale follikels kunnen worden geïsoleerd die vervolgens *in vitro* verder bestudeerd kunnen worden. Biopsienamname bij levende donoren garandeert de mogelijkheid van het verrichten van opvolgingsstudies van de folliculaire populatie, wat niet meer mogelijk is van zodra de donor is geslacht. De combinatie van beide technieken (het injecteren van lokale stimulerende mediators én het wegnemen van kleine stukjes ovarieel cortexweefsel) zal ons mogelijk in staat stellen op een dynamische manier de *in vivo* invloed van tal van stimulerende agentia in beeld te brengen.

## BESLUIT

Sedert het einde van de tachtiger jaren werd mede door middel van echografie duidelijk aangetoond dat de ontwikkeling van antrale follikels tijdens de oestriscyclus verloopt volgens een golvenpatroon, waarbij de meeste runderen per cyclus twee tot drie dergelijke ontwikkelingsgolven vertonen. Na de re-

cruterig ondergaan de antrale follikels een selectieproces, waarbij steeds lagere FSH-concentraties ter beschikking komen van de FSH-afhankelijke follikels. Bij mono-ovulatoire diersoorten groeit na de deviatie slechts één DF verder. Het vermogen van de DF om te kunnen ontwikkelen bij basale FSH-concentraties wordt toegeschreven aan een verschuiving in gonadotropineafhankelijkheid van FSH naar LH. Het exacte mechanisme van follikelselectie is evenwel nog steeds niet opgelost.

Het follikelselectiemechanisme is vermoedelijk ook verantwoordelijk voor het onderscheid tussen mono-ovulatoire en polyovulatoire species. Ditzelfde mechanisme zou dan bij sommige diersoorten, bijvoorbeeld bij het varken, afgesteld zijn op een lagere drempelwaarde, wat zou toelaten om per cohorte meerdere ovulatoire follikels te laten uitgroeien. Studies waarin wordt gezocht naar verschillen in genexpressie en hormoonconcentraties tussen enerzijds hoogfertiële rassen, zoals bijvoorbeeld het Booroolaschaap, en anderzijds de normale populatie, zouden in dit verband zeer interessante informatie kunnen opleveren.

Dankzij de bijdragen van onder andere de moleculaire biologie en de genetica werden reeds grote vorderingen gemaakt in het ontrafelen van het mysterie van de folliculaire ontwikkeling. Ook de *in vitro* cultuur van pre-antrale follikels heeft hierin een belangrijke bijdrage geleverd. Een aantal sleutelmechanismen wordt echter nog steeds niet of onvoldoende begrepen.

Het onderzoek naar de folliculaire dynamiek zou op termijn moeten toelaten om de beschikbare ovariële reserve van primordiale follikels optimaal te benutten en de beperkingen van de voortplanting onder fysiologische omstandigheden te omzeilen. De geassisteerde reproductie zou op die manier een belangrijke bijdrage kunnen leveren tot de selectie van onze huisdieren en tot de preservatie van met uitsterven bedreigde diersoorten.

#### DANKBETUIGING

De auteurs bedanken E. Wechsung en A. Houvenaghel voor het kritisch nalezen van het manuscript.

#### LITERATUUR

Aerts J.M.J., Bols P.E.J., Oste M., Van Ginneken C.J.D., Wechsung E., Houvenaghel A. (2004). Transvaginal ultrasound-guided biopsy of the bovine ovary: a new

- tool for the study of preantral follicles. *Reproduction Fertility and Development* 16, 229-230.
- Armstrong D.G., Webb R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction* 2, 139-146.
- Armstrong D.T. (1993). Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39, 7-24.
- Bartlewski P.M., Beard A.P., Cook S.J., Chandolia R.K., Honaramooz A., Rawlings N.C. (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility* 115, 111-124.
- Bergfeld E.G., Kojima F.N., Cupp A.S., Wehrman M.E., Peters K.E., Mariscal V., Sanchez T., Kinder J.E. (1996). Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. *Biology of Reproduction* 54, 546-553.
- Bo G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31-40.
- Bo G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tribulo R., Tribulo H., Mapletoft R.J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, 53-72.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruif A. (1994). Ovum pick-up bij het rund. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 63, 101-108.
- Bols P.E.J., Ysebaert M.T., Lein A., Coryn M., Van Soom A., de Kruif A. (1998). Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. *Theriogenology* 49, 983-995.
- Bols P.E.J., Vanholder T., Leroy J.L.M.R., Aerts J.M.J., Van Soom A. (2004). Ultrasound-guided transvaginal injection of a low dose of FSH-LH into the bovine ovary as an alternative way to stimulate follicular growth: preliminary results. *Reproduction Fertility and Development* 16, 230-231.
- Bossis I., Wetteman R.P., Welty S.D., Vizcarra J., Spicer L.J. (2000). Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biology of Reproduction* 62, 1436-1444.
- Bouchard P., Wolf J.P., Hajri S. (1988). Inhibition of ovulation: comparison between the mechanism of action of steroids and GnRH analogues. *Human Reproduction* 3, 503-506.
- Chupin D., Combarous Y., Procureur R. (1984). Antagonistic effect of LH in commercially available gonadotrophins. *Theriogenology* 25, 167.
- Crowe M.A., Kelly P., Driancourt M.A., Boland M.P., Roche J.F. (2001). Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intra-follicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. *Biology of Reproduction* 64, 368-374.



- Cupp A.S., Stumpf T.T., Kojima F.N., Werth L.A., Wolfe M.W., Roberson M.S., Kittok R.J., Kinder J.E. (1995). Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or  $17\beta$ -oestradiol. *Animal Reproduction Science* 37, 109-119.
- Chun S.Y., Eisenhauer K.M., Minami S., Billig H., Perlas E., Hsueh A.J. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137, 1447-1456.
- De Rensis F., Peters A.R. (1999). The control of follicular dynamics by PGF $2\alpha$ , GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 49-59.
- Dieleman S.J., Bevers M.M., Vos P.L.A.M., de Loos F.A.M. (1993). PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 39, 25-42.
- Driancourt M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211-1239.
- Eppig J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829-838.
- Erickson B.H. (1966a). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25, 800-805.
- Erickson B.H. (1966b). Development and radio responses of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 11, 97-105.
- Evans A.C.O., Adams G.P., Rawlings N.C. (1994). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100, 187-194.
- Evans A.C.O. (2003). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals* 38, 240-246.
- Figueiredo J.R., Hulshof S.C.J., Van den Hurk R., Ectors F.J., Fontes R.S., Nussgens B., Bevers M.M., Beckers J.F. (1993). Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology* 40, 789-799.
- Fortune J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50, 225-232.
- Gibbons J.R., Wiltbank M.C., Ginther O.J. (1997). Functional interrelationship between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction* 57, 1066-1073.
- Gibbons J.R., Wiltbank M.C., Ginther O.J. (1999). Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction* 60, 72-77.
- Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of Reproduction* 41, 247-254.
- Ginther O.J., Kot K. (1994). Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42, 987-1001.
- Ginther O.J., Kot K., Kulick L.J., Wiltbank M.C. (1997). Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48, 75-87.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R., Kulick L.J., Kot K. (1998). Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology* 50, 507-519.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R., Kulick L.J., Kot K. (1999). Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 h through depression of FSH concentrations. *Theriogenology* 52, 1079-1093.
- Ginther O.J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science* 60-61, 61-79.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R., Kulick L.J., Kot K. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biology of Reproduction* 62, 920-927.
- Ginther O.J., Beg M.A., Bergfelt D.R., Donadeu F.X., Kot K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction* 65, 638-647.
- Gong J.G. (2002). Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 229-241.
- Gougeon A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* 17, 121-155.
- Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmot I., Webb R. (2000). Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology of Reproduction* 62, 1322-1328.
- Hartshorne G.M. (1997). In vitro culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction* 2, 94-104.
- Herrler A., Alsaesser F., Parvizi N., Niemann H. (1991). Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology* 35, 633-643.
- Ireland J. J., Roche J.F. (1982). Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 64, 295-302.
- Kanitz W., Becker F., Schneider F., Kanitz E., Leiding C., Nohner H.-P., Pöhland R. (2002). Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction Nutrition Development* 42, 587-599.
- Kulick L.J., Kot K., Wiltbank M.C., Ginther O.J. (1999). Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* 52, 913-921.
- Lauria A., Genazzani A.R., Oliva O., Inaudi P., Cremonesi F., Monittola C., Aureli G. (1982). Clinical and endocrinological investigation on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility* 66, 219-225.