

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2010- 2011

De zona pellucida, meer dan een fysieke barrière tussen de eicel en de buitenwereld?

door

Carlijne GOOSSENS

Promotor: Dr. K. Goossens
Medepromotor: Prof. Dr. L. Peelman

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

De auteur en de promotor(en) geven de toelating deze studie als geheel voor consultatie beschikbaar te stellen voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van gegevens uit deze studie. Het auteursrecht betreffende de gegevens vermeld in deze studie berust bij de promotor(en).

Het auteursrecht beperkt zich tot de wijze waarop de auteur de problematiek van het onderwerp heeft benaderd en neergeschreven. De auteur respecteert daarbij het oorspronkelijke auteursrecht van de individueel geciteerde studies en eventueel bijhorende documentatie, zoals tabellen en figuren.

De auteur en de promotor(en) zijn niet verantwoordelijk voor de behandelingen en eventuele doseringen die in deze studie geciteerd en beschreven zijn.

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING

INLEIDING	2
AFKORTINGENLIJST	2
LITERATUURSTUDIE.....	3
1. DE EICEL.....	3
1.1. ONTWIKKELING VAN DE GONADEN	3
1.2. FOLLICULOGENESE.....	3
1.2.1. Verschillende ontwikkelingsstadia	4
1.2.1.1. Primordiale follikels	4
1.2.1.2. Primaire follikels.....	4
1.2.1.3. Secundaire of preantrale follikels	4
1.2.1.4. Tertiaire, vesiculaire of antrale follikels	5
1.2.1.5. Rijpe of Graafse follikel	5
1.2.1.6. Diersoortverschillen.....	5
1.2.2. Hormonale invloeden.....	6
2. DE ZONA PELLUCIDA	8
2.1. INLEIDING	8
2.2. HET ONTSTAAN EN HET VERDWIJNEN VAN DE ZONA PELLUCIDA	8
2.2.1. Het ontstaan van de zona pellucida	8
2.2.2. Het verdwijnen van de zona pellucida.....	9
2.3. DE OPBOUW EN DE STRUCTUUR VAN DE ZONA PELLUCIDA	9
2.3.1. De zona pellucida-glycoproteïnen (ZPG's).....	9
2.3.1.1. Structuur van de ZPG's.....	9
2.3.1.1.1. Diersoortverschillen.....	9
2.3.1.1.2. Algemeenheden	10
2.3.1.1.2.1. Zona pellucida-domein (ZPD).....	11
2.3.1.1.2.2. Trefoil-domein (TFD)	11
2.3.1.2. Codering, aanmaak en synthese van de ZPG's.....	11
2.3.1.3. Polymerisatie	12
2.3.2. Zona pellucida structuur bij de muis.....	13
2.4. FUNCTIES VAN DE ZONA PELLUCIDA	15
2.4.1. Inleiding.....	15
2.4.2. Functies tijdens de folliculogenese.....	15
2.4.3. Functies rond de bevruchting.....	15
2.4.3.1. Penetratie door de cumuluscellen en spermabinding	15
2.4.3.2. De acrosoomreactie (AR).....	16
2.4.3.3. Zona pellucida-hardening.....	17
2.4.4. Functies bij het embryo.....	17
2.4.4.1. Bescherming van het embryo.....	17
2.4.4.2. Oriëntatie van de blastocyst-as	18
2.5. DE ZONA PELLUCIDA ALS DRAGER VAN INFECTIE EN ALS ANTICONCEPTIE	18
2.5.1. De zona pellucida als drager van infectie	18
2.5.2. De zona pellucida als anticonceptie	19
ALGEMEEN BESLUIT	20
BIJLAGEN.....	21
LITERATUURLIJST	24

SAMENVATTING

De zona pellucida is een tijdelijke mantel die tijdens de folliculogenese wordt gevormd. Het wordt voor het eerst gezien in de primaire follikels of in de secundaire follikels, naargelang de diersoort. De zona pellucida blijft, na de bevruchting, maar tijdelijk rond het embryo aanwezig; namelijk tot het blastocyst stadium.

De zona pellucida is opgebouwd uit verschillende glycoproteïnen, verschillend naargelang de diersoort. Bij de muis zijn dit mZP1, mZP2 en mZP3. Na polymerisatie van de glycoproteïnen worden er filamenten gevormd. mZP2 en mZP3 vormen lange filamenten die door middel van mZP1 aan elkaar verbonden worden. Hierdoor wordt er een 3D-structuur gevormd en komt de zona pellucida tot stand.

De zona pellucida glycoproteïnen hebben overeenkomstige kenmerken wat betreft hun structuur, waaronder een zona pellucida-domein. Dit domein gaat de polymerisatie van proteïnen tot fibrillen regelen. Sommigen hebben ook nog een trefoil-domein wat mogelijks proteolytische degradatie zal tegengaan.

Het oppervlak van de zona pellucida kan worden opgedeeld in een buitenste, sponsachtige laag en een binnenste, compacte gladde laag. Afhankelijk van de maturiteit van de oöcyt is het oppervlak meer of minder compact.

De zona pellucida heeft verschillende belangrijke functies en is daardoor méér dan een fysieke barrière tussen eicel en buitenwereld.

Tijdens de folliculogenese houdt ze de communicatie van de granulosa-cellen met de oöcyt in stand. Rond de bevruchting zorgt ze voor herkenning en binding van sperma doordat ze een sperma-receptor bevat. Bij de muis gebeurt de primaire binding aan mZP3, de secundaire binding aan mZP2. Deze spermabinding zorgt voor het in gang zetten van de acrosoomreactie, waarbij de zona pellucida doorbroken wordt en bevruchting kan plaatsvinden. Na de bevruchting vindt de zona-hardening plaats: de structuur van de zona pellucida verandert, waardoor polyspermie verhinderd wordt.

Na de bevruchting zorgt ze voor bescherming van het preïmplantatie-embryo; door haar tijdelijke aanwezigheid en doordat ze interageert met oviductines, waardoor een beschermlaag gecreëerd wordt. Ook zorgt ze voor oriëntatie van de blastocyst-as door haar ellipsoïdale structuur. De zona pellucida is dus noodzakelijk voor een normale vroeg-embryonale ontwikkeling.

In de praktijk is de zona pellucida belangrijk bij embryotransplantatie. De zona pellucida kan namelijk drager van infectie worden, wanneer bacteriën of virussen zich hier sterk aan vasthechten. Dit kan voor overdracht van infecties zorgen. Met verschillende wasprocedures wordt getracht dit zoveel mogelijk te voorkomen.

Ook kan juist de afwezigheid van de zona pellucida voordelen bieden in de praktijk. Zo kan er tijdelijke onvruchtbaarheid of sterilisatie worden opgewekt bij dieren door het gebruik van antistoffen gericht tegen antigenen van de zona pellucida.

Al bij al is de zona pellucida dus een zeer belangrijke structuur en zeker méér dan een fysieke barrière tussen eicel en buitenwereld.

Key words: Zona pellucida – Zona pellucida glycoproteïnen – Zona pellucida structuur – Zona pellucida functies- Zona pellucida als drager van infectie en als anticonceptie.

INLEIDING

De zona pellucida (ZP) is een gespecialiseerde structuur die de eicellen van de zoogdieren en het vroege embryo omsluit (Wassarman en Litscher, 2008). Het is een speciale structuur, met veel belangrijke functies, die dienst doet als een soort tijdelijke mantel. De ZP wordt gevormd tijdens de follikelontwikkeling in de primaire follikels bij de mens en de muis (Himmelstein-Braw *et al.*, 1976; Oakberg, 1979) en bij het rund pas in de secundaire follikels (Braw-Tal en Yossefi, 1997). De ZP is maar zeer kort aanwezig, tot net voor de implantatie van het embryo (Wassarman en Litscher, 2008). En toch is de ZP zeer belangrijk, ook al is ze maar zo kort aanwezig.

De vraag die centraal staat in deze literatuurstudie is: **De zona pellucida, meer dan een fysieke barrière tussen de eicel en de buitenwereld?** Dit is de belangrijkste, alles overkoepelende vraag waarop een antwoord zal worden gegeven. Natuurlijk zijn er nog vele andere vragen die gesteld kunnen worden. Waaruit is de ZP opgebouwd en hoe wordt het gevormd? Is de structuur hetzelfde bij de verschillende diersoorten? En wat zijn de precieze functies? Is de ZP belangrijk voor zowel de eicel als het embryo? En als de ZP niet aanwezig is of is veranderd, wat gebeurt er dan? Op deze vragen zal een antwoord worden gegeven in de verschillende hoofdstukken die aan bod komen.

Vooraleer over te gaan tot de structuur en de functies van de ZP zullen in hoofdstuk 1 de voornaamste zaken over de eicel worden uitgelegd. Omdat de ZP al gevormd wordt in de follikels zal eerst uitgelegd worden hoe een eicel is opgebouwd. Verder komen aan bod: het embryonale ontstaan van de ovaria en de follikels, de verschillende soorten follikels en de hormonale regeling ervan.

In het 2^e hoofdstuk zal dieper in gegaan worden op de ZP. Achtereenvolgens wordt de vorming, de opbouw en de structuur van de ZP besproken. Hierbij worden enkele diersoortverschillen aangehaald. Daarna worden de functies van de ZP uitgelegd, waarbij er gekeken wordt naar de functies bij de folliculogenese, rond de bevruchting en bij het embryo. Tot slot worden de verschillende praktische toepassingen van de ZP besproken.

AFKORTINGENLIJST

AR =	Acrosoom reactie
CFCS =	Consensus furine splitsingsite
CTS =	C-terminale subdomein
CTP =	C-terminale propeptide
FSH =	Follikel stimulerend hormoon
hCG=	Humaan choriongonadotrofine
LH =	Luteïniserend hormoon
NTS =	N-terminale subdomein
SEM =	Scanning electron microscopy
SS =	N-terminale signaal sequentie
TFD =	Trefoil-domein
TMD =	Transmembraan domein
ZP =	Zona pellucida
ZPD =	Zona pellucida domein
ZPG's =	Zona pellucida glycoproteïnen

LITERATUURSTUDIE

1. DE EICEL

1.1. ONTWIKKELING VAN DE GONADEN

De ontwikkeling van de gonaden in het embryo start met de vorming van een genitale kam, een soort zwelling. Dit gebeurt bij het rund rond week 4 van de dracht. De gonaden die hierbij gevormd worden ontstaan in de nabijheid van de nier, de zogenoemde mesonephros, namelijk aan de ventro-mediale zijde (Noden en de Lahunta, 1985; Rüsse en Sinowatz, 1991).

De genitale kam bevat in eerste instantie nog geen primordiale stamcellen (Noden en de Lahunta, 1985; Rüsse en Sinowatz, 1991). Deze stamcellen zitten namelijk nog in de dooierzak van het embryo. Ongeveer vanaf week 5 van de dracht gaan deze stamcellen met amoëboïde bewegingen migreren langs de wand van de dikke darm naar de genitale kam (Byskov, 1986; Rüsse en Sinowatz, 1991). Ze vinden hun juiste weg doordat de genitale kam chemotactische signalen uitstuurt (Oktem en Oktay, 2008a). Tijdens deze migratie delen de primordiale stamcellen gestaag via mitose.

De genitale kam wordt geïnfiltrerd door het coelomische epitheel en door cellen van de mesonephros. Dit gebeurt ongeveer op zeven weken van de dracht en dit geeft aanleiding tot de vorming van zogenaamde snoeren of 'cords'. Deze 'cords' kunnen ingedeeld worden op basis van de afkomst van de cellen. Zo is er een 'primitive medullar cord', die is ontstaan uit de cellen van de nier en ook een 'sex cord', gevormd door het epitheel van de coeloomholte (Byskov, 1986; Smitz en Cortvrindt, 2002). In deze 'primary sex cords' worden de primordiale stamcellen gevestigd, die vanaf nu oögonia worden genoemd (Byskov, 1986; Kaipia en Hsueh, 1997; Oktem en Oktay, 2008a).

De oögonia vormen groepen of clusters en vangen verschillende celdelingen aan. De cytoplasmatische scheiding is op dit moment nog onvolledig waardoor de oögonia nog door middel van cytoplasmabrudden aan elkaar vastzitten (Pepling en Spradling, 1998). Vervolgens worden primaire oöcyten gevormd door de aanvang van de meiose. Deze wordt echter snel stopgezet in het diploteen stadium. Primordiale follikels worden gevormd door de groepen te scheiden van elkaar en de cytoplasmabrudden te verbreken. Er ontstaan nu individuele oöcyten, omgeven door een laag van (pre)granulosa cellen. Hieromheen komt nog een basale lamina en de primordiale follikels worden ingebed in de perifere cortex van de ovaria (Merchant-Larios en Chimal-Monroy, 1989; Aerts en Bols, 2010).

De primordiale follikels die aanwezig zijn in de ovaria vormen een reserve aan toekomstige eicellen en bepalen de reproductie capaciteit. Er kunnen er namelijk geen meer bijgemaakt worden, aangezien ze niet prolifereren en de overgang tot primaire follikel onomkeerbaar is (Kezele en Skinner, 2003). Het exacte tijdstip waarop deze reserve wordt vastgesteld is diersoortafhankelijk. Bij de primaten, de herkauwers en de meeste andere huisdieren wordt de definitieve groep vastgesteld tijdens het foetale leven, nog voor de geboorte. Bij knaagdieren daarentegen vindt dit pas kort na de geboorte plaats (Marion en Gier, 1971; Hirshfield, 1991a; Fortune *et al.*, 1998; Smitz en Cortvrindt, 2002).

1.2. FOLLICULOGENESE

De folliculogenese ofwel follikelontwikkeling start bij het begin van de geslachtsrijpe periode. Groepjes follikels gaan groeien en vangen hun ontwikkeling aan. Vele van deze follikels sterven af door middel van atresie en uiteindelijk blijft er één follikel over, de dominante follikel, die zal ovuleren. In de schorszone (de cortex) van het ovaria zijn er dus steeds follikels van verschillende ontwikkelingsstadia te vinden. Hieronder worden de verschillende stadia apart overlopen (Junqueira en Carneiro, 2007).

1.2.1. Verschillende ontwikkelingsstadia

1.2.1.1. Primordiale follikels

Deze follikels vormen de reserve waaruit nieuwe follikels worden geselecteerd om de groei en ontwikkeling aan te vangen. Ze bestaan uit een niet groeiende, primaire oöcyt die omgeven is door granulosa cellen. De granulosa cellen zijn afgeplat en vormen één laag rond de oöcyt. Dit is weergegeven in figuur 1A. De primaire oöcyt bevindt zich nog steeds in de meiose, gepauzeerd in het diploteenstadium (Gougeon, 1996; Braw-Tal en Yossefi, 1997; Junqueira en Carneiro, 2007; Woodruff en Shea, 2007).

1.2.1.2. Primaire follikels

Deze follikels hebben de groei en ontwikkeling aangevangen. De oöcyt wordt groter, terwijl zijn kern in het diploteen stadium blijft. De granulosa cellen worden kubisch in plaats van afgeplat, maar blijven in één laag rond de oöcyt liggen (Fig. 1B). Dit alles wordt nog omsloten door een basale lamina (Gougeon, 1996; Braw-Tal en Yossefi, 1997; Junqueira en Carneiro, 2007; Woodruff en Shea, 2007). Bij de mens en de muis wordt in dit stadium ook de ZP gevormd (Zie 2.2.1.). Rond de oöcyt wordt al een volledige ring zichtbaar (Himelstein-Braw *et al.*, 1976; Oakberg, 1979).

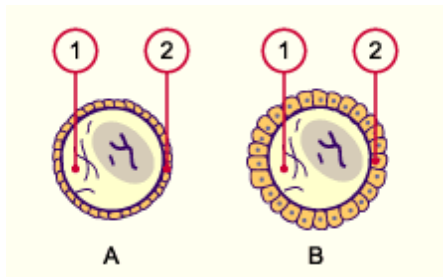


Fig. 1: Structuur van de primordiale en primaire follikel (uit Rasquin, 2010).

A = primordiale follikel

B = primaire follikel

1 = primaire oöcyt

2 = granulosa cellen

1.2.1.3. Secundaire of preantrale follikels

In deze fase ontstaan er meerdere lagen van kubische granulosa cellen rondom de groeiende primaire oöcyt (Gougeon, 1996; Braw-Tal en Yossefi, 1997; Junqueira en Carneiro, 2007; Woodruff en Shea, 2007).

Uit het interstitiële stroma (het bind- of steunweefsel) zijn theca cellen afgeleid, die in de primaire follikels zichtbaar zijn als individuele cellen op de basale lamina (Hirshfield, 1991b). De theca cellen vormen vanaf dit stadium een duidelijke laag, die later wordt omgevormd in een theca interna en een theca externa (Gougeon, 1996; Braw-Tal en Yossefi, 1997; Junqueira en Carneiro, 2007; Fig. 3). In hoofdstuk 1.2.2. worden de functies van deze cellen uitgelegd.

Bij het rond wordt de ZP in deze fase gevormd (Zie 2.2.1.), geïnduceerd door de groei van de oöcyt (Braw-Tal en Yossefi, 1997). De structuur van de secundaire follikel, met zijn verschillende lagen, is weergegeven in de onderstaande figuur (Fig. 2).

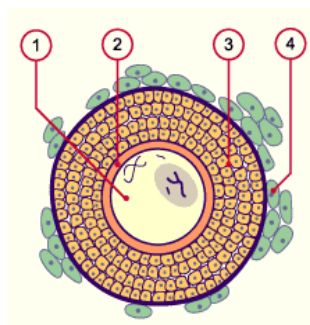


Fig. 2: Structuur van de secundaire follikel (uit Rasquin, 2010).

1 = primaire oöcyt

2 = zona pellucida

3 = granulosa cellen

4 = theca cellen

1.2.1.4. Tertiaire, vesiculaire of antrale follikels

Bij deze follikels ontstaat er een duidelijke holte. Allereerst worden er kleine beetjes heldere vloeistof tussen de granulocellen opgestapeld. Dit vloeit uiteindelijk samen tot één grote holte gevuld met het follikelvocht, dit wordt dan de follikelholte ofwel antrum genoemd (Gougeon, 1996; Smitz en Cortvrindt, 2002; Junqueira en Carneiro, 2007; Woodruff en Shea, 2007). We zien nu de cumulus oöphorus ontstaan; de oöcyt omgeven door granulocellen, die samen uitpuilen als een 'schiereiland' in de follikelholte (Junqueira en Carneiro, 2007). In de onderstaande figuur (Fig. 3) is de structuur van de tertiaire follikel weergegeven.

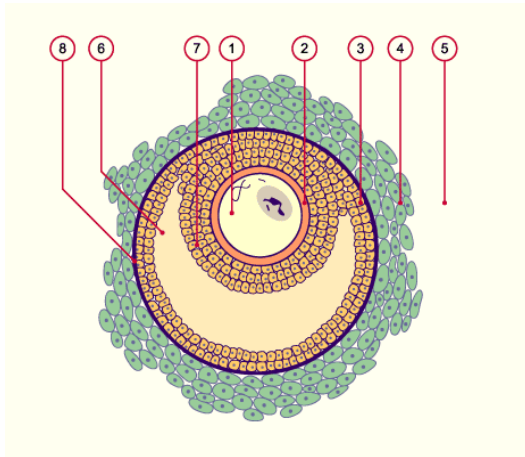


Fig. 3: Structuur van de tertiaire follikel (naar Rasquin, 2010).

1= secundaire oöcyt
2= zona pellucida
3= granulocellen
4= theca interna

5= theca externa
6= follikelvocht
7= granulocellen (corona radiata)
8= scheidingslaag tussen thecacellen en granulocellen

1.2.1.5. Rijpe of Graafse follikel

Dit is de follikel die klaar is voor de ovulatie. Het is een groot, doorschijnend blaasje, dat vaak aan de oppervlakte van het ovarium uitpuilt (Junqueira en Carneiro, 2007). De granulocellen (Fig. 3) staan met de oöcyt in verbinding doorheen de ZP (Zie 2.4.2.; Rüsse, 1983). Na de ovulatie vormen ze een corona radiata, een soort stralenkrans rond de oöcyt (Rüsse, 1983; Junqueira en Carneiro, 2007). Dit is zichtbaar op de onderstaande figuur (Fig. 4).

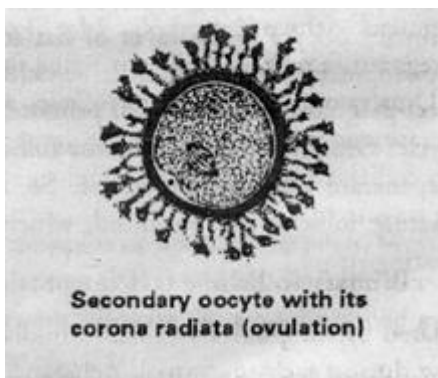


Fig. 4: Corona radiata (uit Sclar Google internetreferentie, 2011).

1.2.1.6. Diersoortverschillen

De ontwikkeling van de follikels bij de verschillende zoogdieren komt redelijk overeen qua morfologie, maar er zijn wel enkele verschillen in ontwikkelingsduur.

Er is namelijk een groot verschil tussen de knaagdieren en de (grote) huisdieren. Zo duurt de ontwikkeling, vanaf de groei-initiatie tot aan de antrale follikel, bij de eerste groep maar enkele weken, terwijl dit bij de andere groep tot verscheidene maanden is (Smitz en Cortvrindt, 2002).

1.2.2. Hormonale invloeden

De follikelontwikkeling wordt geïnhibeerd in het embryo en vangt pas na de geboorte aan. Dit komt doordat er tijdens de zwangerschap hoge concentraties steroïden van de moeder en van het embryo aanwezig zijn, namelijk progesteron en oestradiol. Na de geboorte dalen deze echter snel, waardoor de inhibitie wegvalt en de ontwikkeling begint (Kezele en Skinner, 2003). Pre-implantatie embryo's kunnen verschillende steroïde hormonen produceren, waaronder androgenen, progesteron en verschillende oestrogenen (Loza Arredondo, 1994). Follikelstimulerend hormoon (FSH) en Luteïniserend hormoon (LH) zijn gonadotrope hormonen die door de hypofysevoorkwab worden gemaakt. Zij stimuleren beiden de follikelgroei, en LH zorgt daarenboven nog voor de ovulatie. De eerste fase van de follikelontwikkeling is echter onafhankelijk van deze factoren. De groei van primordiale tot primaire follikel staat namelijk onder de controle van verschillende ovariële factoren (Smitz en Cortvrindt, 2002). Hierna volgt dan een fase waarbij de follikels wel afhankelijk zijn van de gonadotrophines, ook wel rekrutering genoemd.

De follikelontwikkeling is globaal in te delen in 4 grote stappen: De rekrutering of het aanwerven van nieuwe follikels, de selectie, dominantie en atresie.

Rekrutering:

Uit de reserve, gevormd door de primordiale follikels, worden een groepje follikels gerekruteerd. Dit gebeurt tegen het einde van de luteale fase (de fase waarin er een corpus luteum aanwezig is), wanneer de FSH concentratie stijgt (Burvenich, 2008). In de luteale fase wordt namelijk de vrijstelling van LH en FSH geïnhibeerd door progesteron, dat gesecreteerd wordt door het corpus luteum. Wanneer het corpus luteum regresseert, valt de inhibitie weg en wordt er een stijging van de gonadotrophines gezien. Nu kan er een groep, ofwel een golf, van follikels gerekruteerd worden die dan de groei aanvatten. Dit wordt ook wel de 'Wave theory' genoemd (Baird *et al.*, 1975; Burvenich, 2008).

Selectie:

De follikels groeien en ontwikkelen zich en starten met het produceren van oestradiol (Burvenich, 2008). Deze productie ontstaat als volgt:

Tijdens de ontwikkeling worden de FSH-receptoren zichtbaar op de granulocellen (Oktay *et al.*, 1997) en de LH-receptoren op de theca cellen (Sokka *et al.*, 1996; O'Shaughnessy *et al.*, 1997). De theca cellen gaan differentiëren en prolifereren door LH-stimulatie, en produceren ook androstenedione (Zhang *et al.*, 2001; Junqueira en Carneiro, 2007). Dit gaat naar de granulocellen (Magoffin en Erickson, 1994; Junqueira en Carneiro, 2007) die het gaat omzetten in oestradiol, onder invloed van FSH (Richards *et al.*, 1987; Junqueira en Carneiro, 2007). Dit oestradiol heeft volgens Emmen en medewerkers (2005) verscheidene functies. Het stimuleert de vorming van het antrum en de LH-receptor expressie, daarnaast is het ook nodig voor de groei van de follikels en om de atresie te verhinderen.

Oestradiol heeft een negatief-feedback effect op FSH waardoor de concentratie hiervan gaat dalen. Het gevolg hiervan is het ontstaan van een dominante follikel en de atresie van de anderen (Baird *et al.*, 1975; Burvenich, 2008).

Dominantie:

Uit de vele follikels die de groei en ontwikkeling hebben aangevat, blijft er uiteindelijk maar eentje over, de dominante follikel. Dit is de follikel die uiteindelijk, na verdere groei en differentiatie, zal ovuleren. De koe, mens en het paard zijn diersoorten met normaal maar één nakomeling, daar vindt dit

mechanisme van monofolliculaire groei dus plaats. Bij andere diersoorten blijven er meerdere follikels over, zodat een meervoudige ovulatie plaatsvindt en er meerdere nakomelingen in een dracht mogelijk zijn, bijvoorbeeld bij het varken.

Door de FSH daling (zoals hierboven vermeld) zou je verwachten dat de dominante follikel niet meer kan groeien. Dit is echter niet zo, de lage concentratie FSH is voldoende (Burvenich, 2008).

Het blijkt namelijk dat deze lage concentratie voldoende is om de follikelgroei te onderhouden eens deze gestart is, maar onvoldoende voor recrutering van de follikels (Zeleznik en Kubik, 1986). Dat de dominante follikelontwikkeling toch kan doorgaan komt waarschijnlijk door verschillende zaken.

Enerzijds doordat op de granulosa cellen receptoren voor LH ontstaan en anderzijds door de grotere doorstroming van bloed door de follikel (Zeleznik, 1993).

Atresie:

Van de vele follikels die hun groei hebben aangevat, blijven er maar weinig over. Tijdens alle stadia van de ontwikkeling (Hirshfield, 1991a) sterven er follikels af door middel van atresie. Dit alles gebeurt heel gecoördineerd, namelijk door apoptose, een proces dat strikt gecontroleerd wordt door verschillende hormonen (Hsueh *et al.*, 1994). De belangrijkste aanleiding tot atresie is een tekort aan FSH, wat nodig is voor de groei en ontwikkeling.

Buiten wat hierboven besproken is zijn er nog andere factoren (zoals hormonen, groeifactoren etc.) betrokken bij de regulatie in de follikelontwikkeling, de onderlinge communicatie tussen de soorten cellen, de vorming van een dominante follikel en de atresie. Dit behoort echter niet tot het onderwerp van deze scriptie.

2. DE ZONA PELLUCIDA

2.1. INLEIDING

De eicellen van de zoogdieren, evenals de vroege embryo's, worden omgeven door een gespecialiseerde mantel of matrix, de zona pellucida (ZP) genoemd. Deze naam is oorspronkelijk afkomstig van het Latijn en betekent 'gordel' (zona) en 'transparant' (pellucida), ofwel 'transparante/doorzichtige gordel' (Wassarman en Litscher, 2008).

Een gespecialiseerde mantel, zoals de ZP, komt bij eicellen van alle vertebraten voor. Ze worden bij de verschillende diergroepen echter verschillend aangeduid, namelijk als de 'vitelline envelop' bij kikkers, het 'chorion' bij vissen, het 'perivitelline membrane' bij de vogels en als 'ZP' bij de zoogdieren. Deze hebben allen een gelijkaardige structuur met gemeenschappelijke domeinen, bewaard gebleven in de evolutie gedurende miljoenen jaren. Ook hebben ze tijdens de bevruchting en de pre-implantatieontwikkeling overeenkomstige functies (Rankin en Dean, 2000).

2.2. HET ONTSTAAN EN HET VERDWIJNEN VAN DE ZONA PELLUCIDA

2.2.1. Het ontstaan van de zona pellucida

Tijdens de folliculogenese wordt de ZP gevormd. Dit gebeurt naargelang de diersoort op verschillende tijdstippen. Zoals hiervoor vermeld, wordt de ZP bij de mens en de muis het eerst zichtbaar in de primaire follikels (Himelstein-Braw *et al.*, 1976; Oakberg, 1979). Bij het rund gebeurt dit echter pas in de secundaire follikels, geïnduceerd door de groei van de oöcyt (Braw-Tal en Yossefi, 1997).

Wanneer de oöcyt begint te groeien worden er geleidelijk ZP-glycoproteïnen (ZPG's) (Zie 2.3.1.) gemaakt en afgezet tussen de granulosacellen en de oöcyt (Wolgemuth *et al.*, 1984; Lee en Dunbar, 1993). Hierdoor ontstaat er een gelijktijdige toename van de diameter van de groeiende oöcyt en een toename in de zona dikte (Wassarman en Albertini, 1994; Wasserman, 2008). In de onderstaande figuur (Fig. 5) is deze gelijktijdige toename weergegeven. Deze figuur laat ook het expressie-niveau zien van mZP3 mRNA, met een stijging tijdens de oöcyten-groei en een piek bij de volgroeide eicellen (Zie verder bij 2.3.1.2.). Wanneer de oöcyten niet bevrucht werden, werd er een sterke daling gezien (Roller *et al.*, 1989).

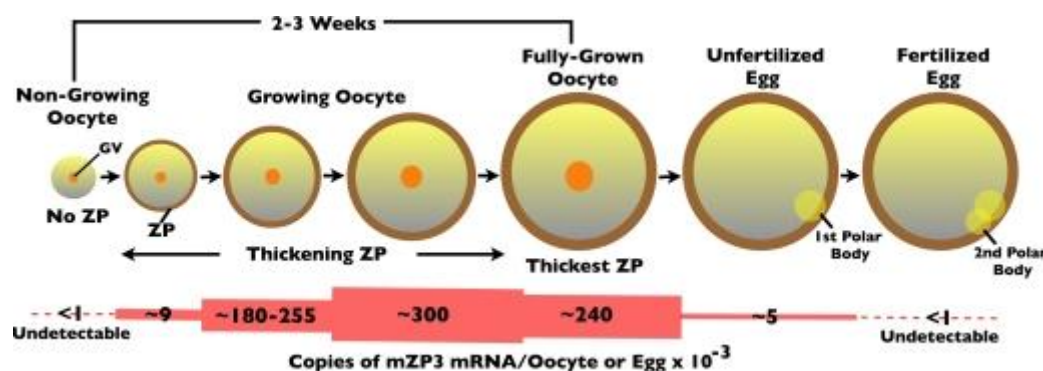


Fig. 5: Schematische voorstelling van de oöcyt-groei en niveau van mZP3 mRNA in de oöcyten en eicellen bij de muis (uit Wassarman, 2008).

GV=germinale vesikel.

Over de synthese-plaats van de ZPG's zijn veel tegenstrijdigheden te vinden in de literatuur. De granulosacellen, de groeiende oöcyten of beiden samen worden gezien als producenten van de glycoproteïnen. Hieronder zullen de tegenstrijdigheden uitgelegd worden.

In muizen vindt de synthese enkel in de oöcyten plaats (Wassarman en Kinloch, 1992; Epifano *et al.*, 1995b). Daarentegen zijn er ook ZP-proteïnen en/of ZP-mRNA gevonden in de granulosacellen bij

andere diersoorten zoals de mens, het varken, de koe en het konijn (Dunbar en Wolgemuth, 1984; Wolgemuth *et al.*, 1984; Maresh *et al.*, 1990; Lee en Dunbar, 1993; Dunbar *et al.*, 1994; Grootenhuis *et al.*, 1996; Kolle *et al.*, 1998).

In het artikel van Familiari en medewerkers (2006) wordt echter, naar aanleiding van resultaten bij muizen, apen en mensen, gezegd dat de granulosa-cellen geen ZPG's maken en de verschillende (positieve) uitkomsten te wijten zijn aan verschillen tijdens de testen, zoals verkeerde fixatietechnieken.

2.2.2. Het verdwijnen van de zona pellucida

De ZP ontstaat tijdens de folliculogenese en is nog steeds aanwezig bij de bevruchte eicel. Tijdens de pre-implantatieperiode wordt het ontwikkelende embryo omgeven door de ZP. Dit blijft zo tot aan het blastocyst stadium. Dan 'kijpt' het embryo uit de ZP en kan zich gaan implanten in wand van de baarmoeder (Rankin en Dean, 2000). Het ontwikkelende embryo met zijn omgevende ZP is weergegeven in figuur 6. De rol van de ZP bij het embryo wordt verder uitgelegd in 2.4.4.

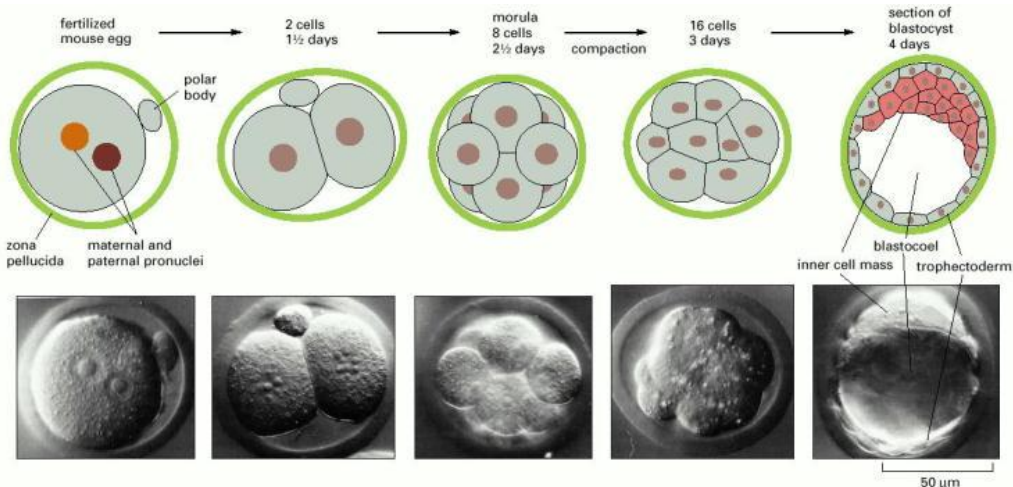


Fig. 6: De zona pellucida bij het ontwikkelende embryo (uit Bedzhov, 2009).

De ZP is dus maar zeer kort aanwezig, namelijk vanaf de eicelontwikkeling tot net voor de implantatie van het embryo. Bij een muis komt dit overeen met een periode van ongeveer 4 weken (Wassarman en Litscher, 2008).

2.3. DE OPBOUW EN DE STRUCTUUR VAN DE ZONA PELLUCIDA

2.3.1. De zona pellucida-glycoproteïnen (ZPG's)

De ZP is opgebouwd uit verschillende proteïnen en uit studies is gebleken dat het hoofdzakelijk gaat om gesulfateerde glycoproteïnen (Bleil en Wassarman, 1980a; Wassarman *et al.*, 1984). Er zijn interspecies verschillen (Wassarman, 1990a; Aviles *et al.*, 1994; Green, 1997; Topper *et al.*, 1997), maar hierna zal voornamelijk worden ingegaan op de opbouw van de ZP van de muis, aangezien hier de meeste studies op gebeurd zijn.

2.3.1.1. Structuur van de ZPG's

2.3.1.1.1. Diersoortverschillen

De ZP bij de muis bestaat uit drie glycoproteïnen, met een proteïnemassa van ongeveer 3.5 ng, en is ongeveer 6.2 µm dik (Bleil en Wassarman, 1980a; Wassarman, 1988, 1999, 2008). De glycoproteïnen worden mZP1, mZP2 en mZP3 genoemd, waarbij de m staat voor muis (Wassarman, 1988). Het grootste deel van de massa van de ZP wordt gevormd door ZP2 en ZP3 (Bleil *et al.*, 1981), met een moleculaire massa van ~120 kDa en ~83 kDa (Bleil en Wassarman, 1980a). Deze 2 ZPG's gedragen

zich op een SDS-PAGE als monomeren. Daarentegen gedraagt ZP1 (~200 kDa) zich als een dimeer, bestaande uit polypeptiden verbonden door disulfiden (Bleil *et al.*, 1981).

In tegenstelling tot bij de muis, bestaat de ZP bij de mens niet uit 3 glycoproteïnen, maar uit 4. Dit zijn hZP1 (~100 kDa), hZP2 (~75 kDa), hZP3 (~55 kDa) en hZP4 (~65 kDa) (Bauskin *et al.*, 1999; Lefievre *et al.*, 2004).

De glycoproteïnen bij het varken zijn: pZP1, pZP2, pZP3 α , pZP3 β en pZP4 (Hedrick en Wardrip, 1987; Hasegawa *et al.*, 1994).

Door de grote overeenkomsten met het varken hebben de glycoproteïnen bij het rund een gelijkaardige benaming gekregen, nl bZP1, bZP2, bZP3- α , bZP3- β en bZP4. Hierbij zijn bZP2 en bZP4 fragmenten van bZP1 (Noguchi *et al.*, 1994; Topper *et al.*, 1997). In bevruchte eicellen wordt de peptidebinding verbroken tussen de 2 delen van het 76 kDa E β C-digest, wat overeenkomt met bZP1 (Noguchi *et al.*, 1994). Hieruit werd geconcludeerd dat bZP2 en bZP4 afkomstig zijn van bZP1 (Topper *et al.*, 1997). Dit komt overeen met de situatie bij het varken, waar pZP1 door reductie van de disulfide-bruggen gedeeltelijk wordt gesplitst in pZP2 en pZP4 (Hasegawa *et al.*, 1994).

De ZP van buideldieren (marsupials) hebben ZPA, een equivalent aan de mZP2, ZPB (~mZP1) en ZPC (~mZP3) (Mate en McCartney, 1998; Haines *et al.*, 1999; McCartney en Mate, 1999).

2.3.1.1.2. Algemeenheden

De ZPG's van verschillende diersoorten hebben overeenkomstige kenmerken wat betreft hun structuur. Zo hebben ze;

- een zona pellucida-domein (ZPD)
- een N-terminale signaal sequentie (SS)
- een C-terminale propeptide (CTP) met een consensus furine splitsing site (CFCS)
- een transmembraan domein (TMD)
- van het N-terminale subdomein (NTS) van de ZPD zijn er vaak vele kopieën
- in sommige gevallen een trefoil domein (TFD) (klaverblad-domein; Jovine *et al.*, 2002a; Jovine *et al.*, 2005; Callebaut *et al.*, 2007). De structuur en de overeenkomstige domeinen van de verschillende ZPG's zijn overzichtelijk weergegeven in de onderstaande figuur (Fig. 7).

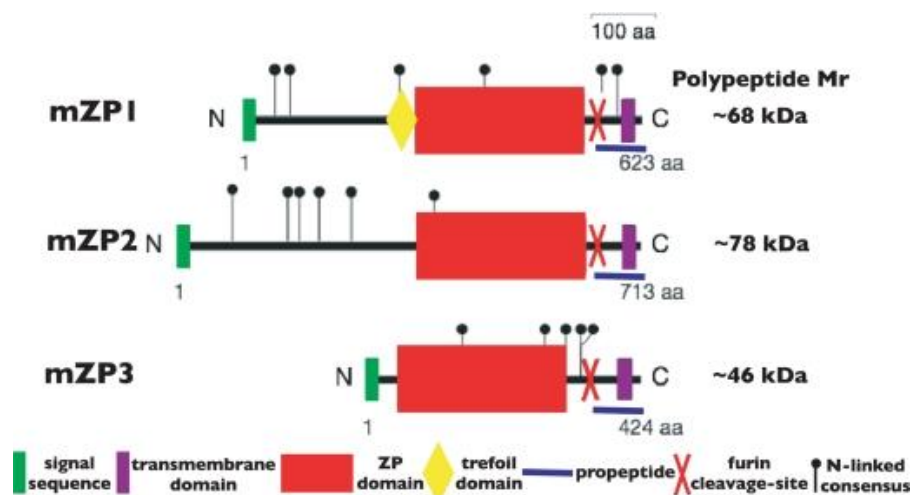


Fig. 7: Schematische weergave van de organisatie van mZP1-3 precursor polypeptiden (uit Wassarman, 2008). Op deze figuur zijn de belangrijkste kenmerken van de polypeptiden aangeduid. De precursoren van elke ZPG zijn op schaal getekend en de N- en de C-termini zijn aangeduid. aa= aminozuren (aantal).

2.3.1.1.2.1. Zona pellucida-domein (ZPD)

Het ZPD is een belangrijk domein dat in alle ZPG's voorkomt. Het maakt zelfs het grootste deel uit van mZP3, namelijk >80% van het polypeptide. Het domein bevat 8 gecondenseerde Cys-residuen en is ongeveer 260 aminozuren lang. De ZP1- en ZP2-domeinen gelijken veel op elkaar (Jovine *et al.*, 2002a; Jovine *et al.*, 2005). Disulfide-bruggen die gevormd worden tussen de Cys-residuen zijn verantwoordelijk voor de 3D-opvouwing van het domein (Kirschhofer *et al.*, 1998; Verhoeven *et al.*, 1998; Moreno-Pelayo *et al.*, 2001; Jovine *et al.*, 2002b; Boja *et al.*, 2003; Yonezawa en Nakano, 2003; Darie *et al.*, 2004).

Het domein bestaat uit 2 subdomeinen, het C-terminale subdomein (CTS) en het NTS, die beiden 4 Cys-residuen bevatten (Jovine *et al.*, 2004; Jovine *et al.*, 2005; Llorca *et al.*, 2007). De polymerisatie van proteïnen tot fibrillen wordt geregeld door ZPD (Legan *et al.*, 1997; Jovine *et al.*, 2002b), voornamelijk door het NTS met zijn Cys-residuen (Jovine *et al.*, 2007). De polymerisatie is een zeer belangrijk proces. Mutaties in het domein zijn niet wenselijk en kunnen leiden tot kanker, onvruchtbaarheid en doofheid (Legan *et al.*, 1997).

2.3.1.1.2.2. Trefoil-domein (TFD)

Dit domein bestaat uit proteïnen, gekenmerkt door 6 cysteïnes. Door disulfide-bruggen wordt er een typische 3-lus structuur gemaakt. De zogenoemde trefoil-factors, vertegenwoordigers van de trefoil-proteïne familie, vormen tussen deze peptidenlussen een hydrofobe groeve. Verondersteld wordt dat dit een mogelijke bindingsplaats is (Petersen *et al.*, 1996; Polshakov *et al.*, 1997; Lemercinier *et al.*, 2001; Thim en May, 2005), o.a. voor zijketens van aromatische aminozuren en oligosacchariden (Gajhede *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1996; Polshakov *et al.*, 1997).

Het TFD komt voor bij leden van de ZP1- en ZP4-familie (Conner en Hughes, 2003; Spargo en Hope, 2003) en het zou mogelijks proteolytische degradatie tegengaan (Bork, 1993; Gajhede *et al.*, 1993). Uit studies blijkt dat de trefoil-factors resistent zijn tegen vertering door protease (Thim en May, 2005) en het feline TFD is ook resistent tegen trypsine (Braun *et al.*, 2009).

ZP1 in de muis bevat een TFD en gaat de verschillende filamenten aan elkaar 'cross-linken' (Wassarman en Litscher, 1995; zie verder bij 2.3.1.3.). Mogelijks speelt het TFD een rol in deze koppeling (Braun *et al.*, 2009).

In de gastrointestinale tractus komen ook trefoil-factoren voor. Deze gaan interageren met mucines (Kondon *et al.*, 1995). In het oviduct worden oviductines gesecreteerd. Dit zijn mucine-achtige proteïnen die interageren met de ZP. Hierdoor wordt er een beschermende laag gevormd rond de oöcyte en het embryo (Malette *et al.*, 1995). Het TFD gaat mogelijks interageren met deze oviductines (Braun *et al.*, 2009).

2.3.1.2. Codering, aanmaak en synthese van de ZPG's

De genen, die coderen voor de ZPG's, zijn single copy genen en liggen verspreid over verschillende chromosomen. Bij de muis zijn dit chromosomen 19, 7 en 5, voor respectievelijk mZP1-3, bij de mens chromosomen 11,16, 7 en 1 voor hZP1-4 (Liang en Dean, 1993; Epifano *et al.*, 1995a; Hughes en Barratt, 1999). Afstamming van een gemeenschappelijk voorouder-gen wordt verondersteld door de aanwezigheid van meerdere gelijkaardige regio's en domeinen bij de ZPG's (Wassarman, 2008). Via mZP3 mRNA expressie-analyse werd een stijging gezien tijdens de oöcyten-groei, met een piek bij de volgroeide eicellen (Fig. 5). Dit kwam overeen met een stijging van de proteïne-synthese. Wanneer de oöcyten niet bevrucht werden, werd er een sterke daling gezien (Roller *et al.*, 1989).

De ZPG's worden als precursor vrijgesteld. Ze bevatten dan nog een SS en een CTP. Wanneer deze precursor van het Endoplasmatisch reticulum naar het Golgi-apparaat wordt getransporteerd, wordt de SS verwijderd (Wassarman, 2008). In een secretorische vesikel wordt de rest verpakt en getransporteerd door het plasma van de oöcyt. Bij de plasmamembraan wordt vervolgens de CTP afgesplitst door het CFCS (Litscher *et al.*, 1999; Williams en Wassarman, 2001; Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002). De glycoproteïnen worden vervolgens in de groeiende ZP geïncorporeerd, in het binnenste oppervlak. Hierdoor groeit de ZP van binnenuit en zijn de oudste proteïnen te vinden in de buitenste laag (Qi *et al.*, 2002).

2.3.1.3. Polymerisatie

De verschillende ZPG's gaan polymeriseren en vormen filamenten, die aan elkaar verbonden worden en de ZP vormen. De lange filamenten bestaan uit polymeren van mZP2 en mZP3 (Greve en Wassarman, 1985). mZP1 gaat de filamenten aan elkaar 'cross-linken' en vormt zo een 3D structuur (Wassarman en Litscher, 1995).

Er zijn verschillende onderzoeken uitgevoerd door Rankin en medewerkers (1999) om de effecten van de noodzakelijkheid van de ZPG's te onderzoeken. Zij hebben muizen-oöcyten gecreëerd die een type ZPG missen (knock-out muizen) en gekeken naar het effect op de structuur van de ZP. De volgende bevindingen kwamen uit deze studies:

* Bij afwezigheid van ZP1 (ZP1-/-) wordt er nog altijd een ZP gevormd, maar deze is dunner dan normaal. De vrouwelijke muizen zijn nog vruchtbaar, maar produceren kleinere nesten (dus een daling van de fertiliteit), doordat ook de ZP-structuur wat is aangetast (Rankin *et al.*, 1999). De aanwezigheid van ZP2 en ZP3 is voldoende om een ZP te vormen, maar door de afwezigheid van ZP1 is er een insufficiënte cross-linking tussen de filamenten. Dit resulteert in grote poriën in de ZP (Dean, 2007). In figuur 8 is weergegeven dat de ZP bij ZP1-nul muizen veranderd is in vergelijking met de normale muizenstam.

* Bij ZP2-/- muizen wordt er een dunne ZP gevormd, door de synthese van ZP1 en ZP3. De afwezigheid leidt tot een slechtere folliculaire ontwikkeling en een daling van het aantal geövuleerde eicellen (Rankin *et al.*, 2001).

* Bij muizen zonder ZP3 zien we dat er helemaal geen ZP wordt gevormd (Fig. 8). ZP1 en ZP2 worden wel gemaakt, maar deze zijn niet voldoende om een goede ZP te vormen. De afwezigheid van de ZP resulteert in onvruchtbaarheid (Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996). Rankin en medewerkers (1998) hebben experimenten uitgevoerd waarbij humaan ZP3 werd ingefokt in de ZP3-/- muizenstammen. Bij deze zogenaamde 'huZP3-rescue muizen' werd gezien dat de ZP-matrix en de fertiliteit werd hersteld door de invoer van humaan ZP3.

Om de ZP te vormen is de aanwezigheid van ZP3 dus absoluut noodzakelijk en ZP1 is minder belangrijk. De vorming van de verschillende ZPG's gebeurt onafhankelijk van elkaar (Epifano *et al.*, 1995b).

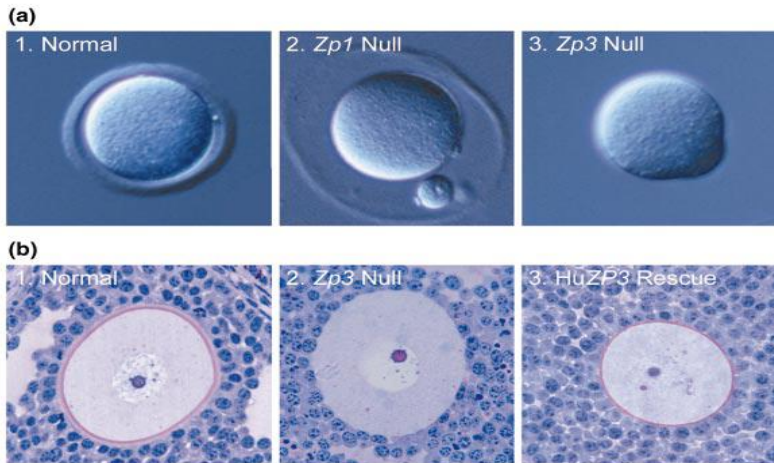


Fig. 8: Zona pellucida bij normale en knock-out muizen (uit Rankin en Dean, 2000).

(a) Geïsoleerde geövuilde eicellen uit normale, ZP1-nul en ZP3-nul vrouwtjes. De zona matrix is significant veranderd bij ZP1-nul muizen en volledig afwezig in ZP3-nul vrouwtjes.

(b) Histologische coupes van eierstokweefsel (PAS-kleuring) van de normale, ZP3-nul en huZP3-rescue muizen. Eicellen van de huZP3-rescue muizen konden wel een ZP vormen, in tegenstelling tot de ZP3-nul eicellen.

2.3.2. Zona pellucida structuur bij de muis

De ZP kan worden opgedeeld in een buitenste en een binnenste oppervlak, wanneer gekeken wordt met scanning electron microscopy (SEM). De binnenste laag is compact en glad (Phillips en Shalgi, 1980b), terwijl de buitenste laag er wat sponsachtig uit ziet door de vele poriën (Motta en Van Blerkom, 1975; Phillips en Shalgi, 1980a, 1980b; Von Weymarn *et al.*, 1980). In figuur 9 zijn verschillende SEM-opnamen weergegeven.

Met een specifieke kleuring kunnen verschillende concentrische lagen gezien worden (Baranska *et al.*, 1975). Zo hebben antrale follikels 3, en de Graafse follikels 4 lagen (Kaufman *et al.*, 1989). Embryo's, evenals onbevruichte eicellen, hebben een 2-lagige ZP (Baranska *et al.*, 1975). Bij de bevruchte eicel worden er 4 lagen gezien. Twee lagen hiervan lijken erg op de lagen die aanwezig zijn bij de onbevruichte eicel. Er is dus een wijzing in structuur: namelijk van 2 lagen bij de onbevruichte eicel naar 4 lagen bij de bevruchte eicel (Baranska *et al.*, 1975). Dit geheel van veranderingen wordt de zona reactie (Braden *et al.*, 1954) ofwel de zona hardening genoemd (Rankin en Dean, 2000; Gardner *et al.*, 2007; zie verder bij 2.4.3.3.).

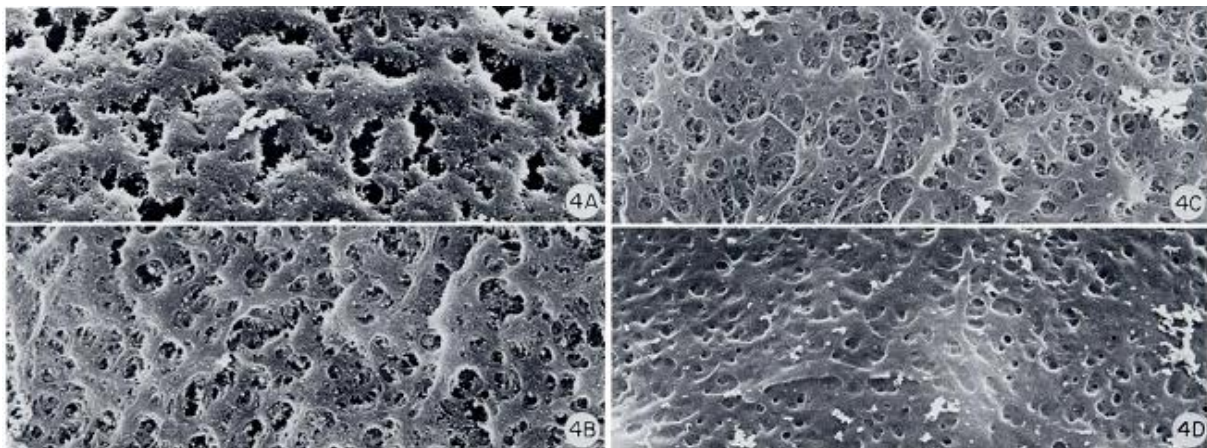


Fig. 9: SEM-opname bij de muis van de zona van een: (naar Jackowski en Dumont, 1979).

A= Onbevruichte eicel. De buitenkant van de ZP is ruw met diepe groeven.

B= Eicel rond de bevruchting. Zaadcellen waren nog steeds verbonden aan deze zona. Het oppervlak is gladder met minder diepe groeven.

C= Bevruchte eicel 18uur na humaan choriongonadotrofine (hCG). Het oppervlak is draderig en poreus. De poriën zijn 0,5-0,9 μm diameter.

D= Ongeveer 11uur na bevruchting (26uur na hCG). Het oppervlak is gladder met minder duidelijke poriën.

Wanneer er gekeken wordt naar de maturiteit van de oöcyt (Calafell *et al.*, 1992), komt een compacte ZP overeen met atretische of immature oöcyten, terwijl de rijpe eicellen een netachtige zona hebben (Familiari *et al.*, 1989).

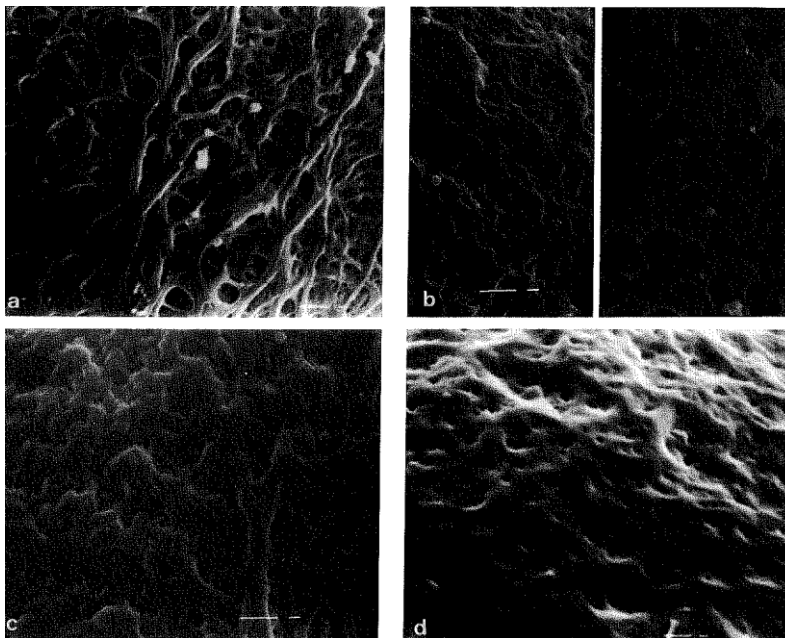
De ZP kan worden ingedeeld in verschillende types. Dit is meerdere malen gebeurd. Zo werd door Nogues en medewerkers (1988) de ZP bij de muis ingedeeld in 4 groepen, nl A, B, C, D. De structuur van deze types is weergegeven in figuur 10.

* A: Dit type wordt enkel gezien in jonge of prepuberale vrouwtjes, meteen na de ovulatie. De ZP heeft talrijke poriën en vormt een fibreus netwerk.

* B: De zona vertoont hier kleinere poriën en heeft een vlakker uitzicht. Dit type ZP komt het meeste voor.

* C: De poriën zijn verdwenen en het oppervlak is ruwer geworden. Dit wordt gezien voor de degeneratie van de oöcyt.

* D: Dit type ZP wordt waarschijnlijk gezien bij gedegenererde oöcyten. Het oppervlak van de zona is vlak geworden en amorf van structuur.



*Fig. 10: Verschillende types ZP, verkregen met de SEM (uit Nogues *et al.*, 1988).*

a= type A (fibreus, grote poriën), b= twee verschillende types B (kleinere poriën), c= type C (ruw, geen poriën), d= type D (amorf en vlak).

Een aantal jaren later is de ZP opnieuw ingedeeld in verschillende types, ditmaal door Calafell en medewerkers (1992).

* Y-type: De ZP is amorf en ongestructureerd, met geen of weinig zeer kleine poriën. Dit type is geassocieerd met zeer immature oöcyten en is helemaal bedekt door debris, afkomstig van de ZP zelf.

* Z-type ZP: De oöcyten zijn al wat meer gerijpt (metaphase II) en de ZP is meer gestructureerd. Het bevat kleine ondiepe poriën.

* A/B-type: Hierbij wordt er een fibreus netwerk gezien met veel grote poriën. Dit type komt overeen met volledig gerijpte eicellen, die vers geövuleerd zijn.

* C-type ZP: Dit type is geassocieerd met de wat oudere eicellen. De ZP bevat enkele poriën en heeft een ruw oppervlak, zonder debris.

* D-type: De ZP is ongestructureerd en vlak met een amorf oppervlak. Dit laatste type komt overeen met oöcyten die gedegenererd zijn (Nogues *et al.*, 1988; Calafell *et al.*, 1992).

2.4. FUNCTIES VAN DE ZONA PELLUCIDA

2.4.1. Inleiding

De ZP is zoals eerder vermeld een soort mantel die rond de eicel en rond het embryo gelegen is. Maar is de ZP dan enkel een fysieke barrière? Of is het meer dan dat, en heeft het nog verscheidene functies? 'Ja', is het korte en duidelijke antwoord op de laatste vraag. De ZP is méér dan een fysieke barrière tussen eicel en buitenwereld. De ZP vervult meerdere rollen en taken, waardoor het een structuur is die zeer belangrijk is en onmisbaar voor de normale ontwikkeling. Zo speelt het onder andere een rol bij de bevruchting en de preimplantatieperiode (Wassarman, 2008). Hieronder zullen de verschillende functies overlopen en uitgelegd worden.

2.4.2. Functies tijdens de folliculogenese

Granulosacellen kunnen tijdens de follicelontwikkeling communiceren met de oöcyt en met omgevende granulosacellen. Dit gebeurt in beide richtingen en wordt mogelijk gemaakt door 'gap juncties'. De oöcyt krijgt informatie van de granulosacellen maar ook voedingsstoffen, wat noodzakelijk is aangezien de follicel avasculair is. Dit komt doordat hij van de bloedvaten afgesloten is door omsluiting door de basale lamina (zie 1.2.1.2.). De oöcyt reguleert op haar beurt de differentiatie en proliferatie van de granulosacellen (Oktem en Oktay, 2008b).

Wanneer de ZP is gevormd, ondersteunt ze deze communicatie en houdt ze in stand. De communicatie via de gap juncties blijft bestaan (Senbon *et al.*, 2003) en er komen cytoplasmatische 'bruggen' doorheen de ZP, die zorgen voor de communicatie van de granulosacellen naar de oöcyt (Rüsse, 1983).

2.4.3. Functies rond de bevruchting

Net voor en na de bevruchting speelt de ZP een belangrijke rol. Het zorgt voor de herkenning van de eicel door het sperma, de spermabinding en de initiatie van de acrosoom reactie. Na de bevruchting verandert de structuur van de ZP, waardoor polyspermie verhinderd wordt (Rankin en Dean, 2000). Deze functies worden hieronder apart overlopen.

2.4.3.1. Penetratie door de cumuluscellen en spermabinding

Sperma dat in de vrouwelijke voortplantingstractus is gedeponneerd heeft nog een moeilijke weg te gaan vooraleer er bevruchting kan plaatsvinden. Allereerst moet het sperma capacitatie ondergaan om bevruchtungskrachtig te worden, daarnaast moet het nog verschillende barrières doorbreken om tot de eicel te komen (Wolpert *et al.*, 2002). Met capacitatie wordt het geheel van gebeurtenissen bedoeld die gaan inwerken op de zaadcellen. Hierdoor wordt het sperma aangepast en krijgt het zijn vermogen om te bevruchten (Visconti *et al.*, 1998).

De eerste barrière die de spermatozoa tegen komen zijn de cumuluscellen rondom de geövuleerde oöcyt (Zie 1.2.1.5. bij Fig. 4; Wolpert *et al.*, 2002).

Deze laag wordt doordrongen door een combinatie van hypermotiliteit (Yanagimachi, 1994) en de werking van het enzyme hyaluronidase (Lin *et al.*, 1994; Wolpert *et al.*, 2002), dat zich bevindt op de spermakop (Wolpert *et al.*, 2002). Dit is weergegeven in figuur 12.1.

Eenmaal deze laag doorbroken is, is de volgende barrière aan de beurt: de ZP. De ZP bevat een 'sperma receptor', die de spermacellen herkent en bindt. Bij de muis gebeurt de primaire binding aan mZP3 (Bleil en Wassarman, 1980b; Bleil en Wassarman, 1986; Wassarman, 1990b; Mortillo en Wassarman, 1991). Later, na de acrosoomreactie (AR), vindt er een secundaire binding plaats aan mZP2 (East *et al.*, 1984, 1985; Bleil *et al.*, 1988).

Dit is echter niet bij alle diersoorten hetzelfde. In bijlage 1 zijn de verschillende functies van de ZP-

proteïnen bij de verschillende diersoorten weergegeven. Zo wordt er gezien dat bij het konijn het sperma niet enkel bindt aan ZP3, maar ook aan ZP1 (Yamasaki *et al.*, 1995). Bij het varken gebeurt dit aan hetero-complexen van ZP1 en ZP3 (Yurewicz *et al.*, 1998).

De exacte locatie en structuur van de regio van het ZP3 waarop het sperma bindt, door Wassarman en Litscher (2008) ook wel 'sperma combining-site' genoemd, is nog niet helemaal duidelijk. ZP3-oligosacchariden, evenals ZP3-polypeptiden, blijken een rol te spelen. Het oligosaccharide wordt waarschijnlijk herkend en gebonden door het sperma, terwijl het polypeptide een rol zou spelen in de inductie van de AR (zie 2.4.3.2.; Wassarman, 1990b) en de species-specifieke binding van sperma aan de eicel (Wassarman en Litscher, 2008).

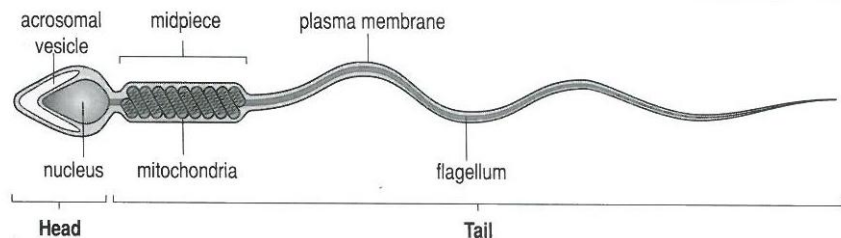
Niet al het sperma wordt gebonden, enkel sperma met een intact acrosoom kan binden (Bleil en Wassarman, 1980b; Bleil en Wassarman, 1986; Wassarman, 1990b; Mortillo en Wassarman, 1991). De binding aan mZP3 vindt alleen plaats bij onbevuchte eicellen, bij bevruchte eicellen of embryo's gaat dit niet door. Dit komt doordat de spermareceptor door de zona-hardening (zie 2.4.3.3.) is gewijzigd. Hierdoor wordt het niet meer herkend door het sperma en vindt er geen binding plaats (Wassarman *et al.*, 1999).

2.4.3.2. De acrosoomreactie (AR)

Wanneer het sperma gebonden is aan de ZP moet hij deze laag nog penetreren. Hierbij komt zijn acrosoom van pas, een grote secretorische vesikel die enzymen bevat. Deze vesikel is gelegen in de kop van de spermatozoa, over de nucleus (Yanagimachi, 1994; Wassarman, 1999; Wolpert *et al.*, 2002). In de onderstaande figuur (Fig. 11) is dit weergegeven.

Fig. 11: Schematische voorstelling van een humane spermacel (uit Wolpert et al., 2002).

Het acrosoom bevat enzymen om de beschermende lagen rondom de eicel te verteren. Het plasmamembraan, op de kop van de spermacel, bevat verschillende gespecialiseerde proteïnen die binden aan de eicel. De spermacel beweegt zich voort met zijn flagel. De energie die hiervoor nodig is wordt gemaakt door de mitochondriën.



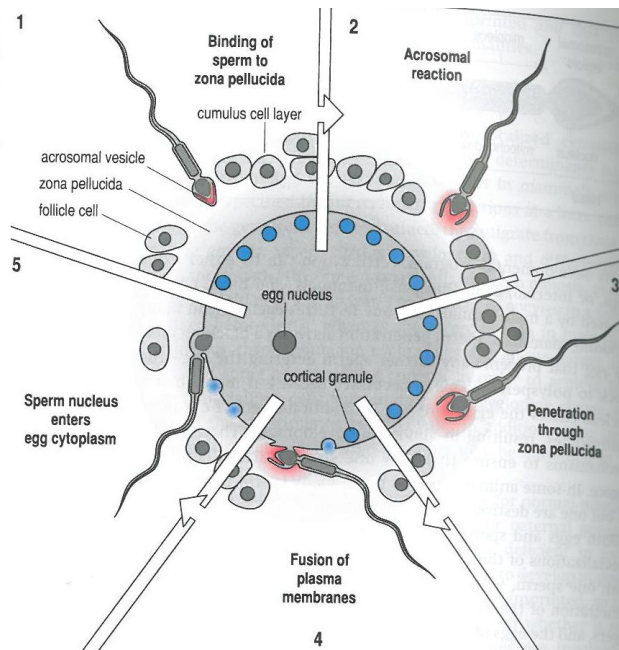
Wanneer acrosoom-intact sperma bindt aan ZP3 wordt de AR in gang gezet (Bleil en Wassarman, 1983; Darszon *et al.*, 1996; Florman *et al.*, 1998; Wolpert *et al.*, 2002). In figuur 12.2 en 12.3 is dit schematisch weergegeven. Door middel van exocytose wordt de inhoud van het acrosoom (waaronder het protease acrosine) vrijgesteld. Ook β -N-acetylglucosaminidase komt vrij en gaat oligosaccharide-zijketens van de ZPG's afbreken. Door deze enzymen wordt de ZP doorbroken en kan de plasmamembraan van de eicel bereikt worden door het sperma. Op het spermaoppervlak worden door de AR proteïnen blootgelegd. Deze proteïnen zijn nodig voor de binding en de fusie met de plasmamembraan van de eicel. Hierna kan de bevruchting plaatsvinden (Wolpert *et al.*, 2002; Fig. 12).

Maar hoe kan het sperma door de ZP heen, terwijl de ZP nog aanwezig is bij het embryo? Deze structuur is namelijk zeer belangrijk voor zowel steun als bescherming voor het embryo. Het sperma moet dus door de ZP penetreren en het gelijktijdig toch nog intact houden (Prasad *et al.*, 2000). Bij het varken zijn er verschillende studies uitgevoerd door Dunbar en medewerkers (1985) en Dunbar en Bundman (1987), waarbij de ZP werd behandeld met enzymen. Bij deze studies werd het volgende

gevonden:

- ZP1 ondergaat gedeeltelijke proteolyse.
- ZP3 blijft intact.
- ZP2 en ZP4 (beide tot de ZP2-familie behorend) ondergaan volledige proteolyse.

Dit is een sterke aanwijzing dat tijdens de bevruchting de structuur van de ZP zoveel mogelijk intact wordt gehouden door ZP1 en ZP3, terwijl de spermapenetratie mogelijk wordt gemaakt door de proteolytische splitsing van het ZP2-proteïne (Dunbar *et al.*, 1985; Dunbar en Bundman, 1987).



*Fig. 12: Verschillende stappen van de bevruchting van een zoogdieren-eicel (uit Wolpert *et al.*, 2002).*

- 1: De spermacel doorbreekt de laag van cumuluscellen en bindt vervolgens aan de ZP.
- 2: Binding aan ZP3 initieert de acrosoom reactie.
- 3: Bij de AR komen enzymen vrij die de ZP gaan afbreken. Hierdoor kan het sperma penetreren doorheen de ZP.
- 4: Spermia bindt aan het plasmamembraan van de eicel en fuseert hiermee.
- 5: Door de fusie wordt de eicel geactiveerd, wat leidt tot vrijstelling van corticale granules, waarna de spermanucleus de eicel kan binnengaan.

2.4.3.3. Zona pellucida-hardening

Het is van belang dat er maar één spermatozoa de eicel bevrucht. Hiervoor biedt de ZP een uitkomst. Net na de bevruchting verandert de structuur van de ZP waardoor gebonden spermatozoa niet meer kunnen penetreren en vrije spermatozoa niet meer kunnen binden aan de ZP (Rankin en Dean, 2000; Gardner *et al.*, 2007). Dit proces wordt de 'zona reactie' (Braden *et al.*, 1954) of de 'ZP-hardening' genoemd en draagt bij tot het voorkomen van polyspermie (Rankin en Dean, 2000; Gardner *et al.*, 2007). Met zona-hardening wordt zowel de daling in sperma-binding en -penetratie bedoeld, als ook de verlengde tijd om de ZP enzymatisch af te breken (Dodson *et al.*, 1989).

De structuurverandering van de ZP wordt veroorzaakt door de vrijstelling van corticale granules en hun inhoud, kort na de fusie van het sperma met de eicel (zie figuur 12.5; Rankin en Dean, 2000; Wolpert *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2007). Hierbij wordt mZP3 veranderd, van een actieve naar een inactieve receptor (Wassarman, 2005), waardoor het niet meer herkend wordt door het sperma (Wassarman *et al.*, 1999). Het is nog onduidelijk hoe dit in zijn werk gaat (Wassarman, 2005).

2.4.4. Functies bij het embryo

2.4.4.1. Bescherming van het embryo

Na de bevruchting blijft de ZP nog een tijd bestaan en is aanwezig rond het embryo gedurende de preimplantatieperiode. Deze aanwezigheid zorgt voor bescherming van het embryo tijdens zijn tocht door het oviduct. Dit gebeurt als volgt:

In het oviduct worden oviductines gesecreteerd. Dit zijn mucine-achtige proteïnen die interageren met

de ZP. Hierdoor wordt er een beschermende laag gevormd rond de oöcyt en het embryo (Malette *et al.*, 1995).

Muizenembryo's waarbij de ZP is verwijderd voor het vier-cellige stadia blijken zich niet te kunnen inplanten in de uteruswand. In plaats van implantatie hechten ze zich vast aan het epitheel van het oviduct. Ze kunnen niet delen en sterven uiteindelijk af (Bronson en McLaren, 1970; Modlinski, 1970).

2.4.4.2. Oriëntatie van de blastocyst-as

Tijdens de embryonale ontwikkeling speelt de ZP ook nog een andere rol.

De embryonale-as van de blastocyst, ook wel embryonale-abembryonale-as of blastocyst-as genoemd, en het eerste splitsingsvlak zijn bijna loodrecht (Gardner, 2001; Piotrowska en Zernicka-Goetz, 2001; Piotrowska *et al.*, 2001; Fujimori *et al.*, 2003; Piotrowska-Nitsche en Zernicka-Goetz, 2005; Gardner, 2007). Hier is waarschijnlijk de ZP verantwoordelijk voor, alhoewel hierover nog onduidelijkheid bestaat.

De ZP heeft een ellipsoïdale structuur die behouden blijft tot het vroege blastocyst-stadium (Kurotaki *et al.*, 2007). Waarschijnlijk wordt er door deze speciale vorm een asymmetrische druk gecreëerd waardoor de blastocyst-as georiënteerd wordt (Motosugi *et al.*, 2005). De oriëntatie van de eerste celdeling zou hier ook door worden beïnvloed (Alarcon en Marikawa, 2003; Motosugi *et al.*, 2005).

2.5. DE ZONA PELLUCIDA ALS DRAGER VAN INFECTIE EN ALS ANTICONCEPTIE

2.5.1. De zona pellucida als drager van infectie

De ZP is over het algemeen een goede barrière tegenover pathogenen, maar het is niet altijd effectief. Het kan toch gebeuren dat er infectie plaatsvindt met bacteriën of virussen. Zo zijn er pathogenen die zo sterk vasthechten aan de ZP dat ze niet verwijderd kunnen worden met de wasprocedures (Singh, 1987; Rohde *et al.*, 1990; Otoi *et al.*, 1992, 1993). Hiertoe behoren bacteriën zoals *Escherichia coli*, *Brucella ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Streptococci* en *Mycoplasma spp.* (Singh, 1987; Rohde *et al.*, 1990; Otoi *et al.*, 1992, 1993) en virussen zoals het Porcine parvovirus (Wrathall en Mengeling, 1979a, 1979b) en het African swine fever virus (Singh *et al.*, 1984). Overzichten hiervan worden in de verschillende bijlagen (2 t/m 5) weergegeven.

Embryotransplantatie wordt hedendaags steeds meer toegepast. Dit is echter een techniek die niet zonder gevaar is, doordat de zona-barrière niet altijd effectief is. Zo kunnen er met het embryo ook pathogenen overgebracht worden. De interactie tussen het embryo en het pathogeen kan op verschillende manieren plaatsvinden:

* Op het moment van de bevruchting is het pathogeen al in de eicel aanwezig.

* Tijdens de bevruchting komt het pathogeen in de eicel, bijvoorbeeld door hechting aan het sperma, en kan later het embryo infecteren.

* Het pathogeen kan zich inbedden in of zich hechten aan het oppervlak van de ZP of kan zelfs door de ZP passeren.

* Ook kan het pathogeen het embryo bereiken na schade aan de ZP door bijvoorbeeld manipulatie (Hare, 1984).

Bij de laatste twee mogelijkheden wordt het embryo geïnfecteerd na het uitkippen (Apelo en Kanagawa, 1989). Op de besmetting door binding aan of penetratie door de ZP wordt hieronder verder ingegaan.

Een virus kan volgens Bolin en medewerkers (1983), na onderzoek op varkensembryo's, op verschillende manieren gaan interageren met de ZP:

- * Het virus gaat interageren met het cel-debris wat met de ZP geassocieerd is.
- * Het virus bindt op receptoren die aanwezig zijn op de ZP.
- * Het virus raakt vast in de poriën of de spermatracten op de ZP.

Wanneer een virus bindt op de receptoren kan de ZP dus een drager van infectie worden (Van Soom *et al.*, 2010). Dit is echter niet wenselijk en men tracht dan ook de pathogenen te verwijderen. Dit gebeurt door middel van de zogenaamde 'wasprocedures', waarbij de ZP-intacte embryo's worden gewassen (Bolin *et al.*, 1982; Stringfellow, 1998). Dit is echter niet effectief voor alle virussen, daarom kan een extra behandeling met het enzyme trypsine nog noodzakelijk zijn, waarbij de virussen geïnactiveerd of verwijderd worden (Singh *et al.*, 1982a; Stringfellow, 1990). Volgens Van Soom en medewerkers (2010) zou trypsine volgens een aantal mechanismen kunnen werken. Trypsine zou namelijk:

- * de conformatie van de virale receptoren op de ZP kunnen veranderen.
- * bepaalde proteïnen in de virale envelop kunnen verteren. Hierdoor zou de aanhechting of binding aan de ZP voorkomen kunnen worden.

Verder kan gebruik gemaakt worden van antibiotica in het medium (Stringfellow en Seidel, 1990; Otoi *et al.*, 1992; Riddell *et al.*, 1994), aangezien trypsine niet werkt tegen bacteriën (Riddell *et al.*, 1994). Ook het gebruik van fotosensitieve stoffen, ultraviolet licht en organische halamines is onderzocht geweest. Het gebruik hiervan is echter beperkt door de smalle marge tussen embryocide en antimicrobiële activiteit (Bielanski en Hare, 1991; Bielanski *et al.*, 1992).

Na al de voorgaande handelingen kan het toch nog zijn dat er pathogenen zijn die niet verwijderd kunnen worden en aanwezig blijven aan de ZP. Er zijn dus verschillende situaties mogelijk:

- * Pathogeen penetreert door de ZP (Apelo en Kanagawa, 1989). Dit is o.a. zo voor het Sendai virus (Tuffrey *et al.*, 1972) en het Encephalomyocarditis virus (Gwatkin, 1967; Bijlage 2).
- * Pathogeen hecht vast aan de ZP en kan verwijderd worden door wassen (Apelo en Kanagawa, 1989). Bijvoorbeeld Bovine leukemie virus (Hare *et al.*, 1985) en het Infectieuze bovine rhinotracheïtis virus (Singh *et al.*, 1982b; Bijlage 4).
- * Pathogeen hecht vast aan de ZP en kan niet verwijderd worden door de wasprocedures (Apelo en Kanagawa, 1989), zoals het African swine fever virus (Singh *et al.*, 1984; Bijlage 5).

Zoals uitgelegd in 2.3.1.1.1. zijn er heel wat diersoortverschillen in de structuur en de samenstelling van de ZP. Hierdoor zullen er tevens verschillen zijn bij de verschillende diersoorten in welke pathogenen zullen penetreren of zich zullen vasthechten aan de ZP, alsook hoe sterk deze binding zal zijn (Hansen, 1992). In bijlagen 2 t/m 5 staan tabellen waarin overzichten worden gegeven o.a. welke pathogenen de ZP kunnen penetreren, welke pathogenen de ZP niet kunnen penetreren, het effect van de wasprocedures op de verschillende pathogenen en de specifieke pathogenen bij de verschillende diersoorten.

2.5.2. De zona pellucida als anticonceptie

In het verloop van deze literatuurstudie is het duidelijk geworden dat de ZP een structuur is met veel verschillende en belangrijke functies, onmisbaar voor een normale embryonale ontwikkeling. Belangrijk hierbij is de aanwezigheid en intactheid van de ZP. Maar, ook juist inhibitie van bepaalde functies of een structuurverandering van de ZP kan zo zijn voordelen hebben voor de mens. Zo kan er tijdelijke onvruchtbaarheid of sterilisatie worden opgewekt bij dieren door het gebruik van antistoffen gericht tegen antigenen van de ZP (Prasad *et al.*, 1999).

Deze anticonceptie kan veroorzaakt worden door antistoffen tegen de ZP-proteïnen. Hierdoor kan er

een directe immunologische inhibitie ontstaan van zowel de spermabinding als de penetratie (Wood *et al.*, 1981), maar ook kan de normale follikelontwikkeling worden beïnvloed (Dunbar, 1990). Door immunisatie kan namelijk een immuunrespons ontstaan (Wood *et al.*, 1981; Skinner *et al.*, 1984; Mahi-Brown *et al.*, 1988; Dunbar *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Rhim *et al.*, 1992) of de interactie tussen de granulosa-cellen en de oöcyt kan worden geremd, aangezien de antistoffen doorheen het follikelvocht kunnen (Skinner en Dunbar, 1986). Naar de anti-ZP antistoffen en de identificatie van de specifieke epitopen werd veel onderzoek gedaan (Prasad *et al.*, 1999).

De resultaten van immunisatie zijn uiteenlopend, een overzicht hiervan wordt weergegeven in bijlage 1. Zo werd er een onregelmatige en broze ZP gezien wanneer muizen actief werden geïmmuniseerd met hamster ZP, terwijl er toch normale ovulatie optrad (Gwatkin *et al.*, 1977). Bij studies van Wood en medewerkers (1981), waar hetero-immunisatie met varkens-ZP bij konijnen werd uitgevoerd, trad er echter geen normale ovulatie op. De ovaria's waren kleiner en lichter en bleken weinig of geen rijpe follikels te bevatten. Normale eicellen of embryo's werden niet teruggevonden, wel cel-massa's bij spoelingen van de oviduct. Vermoed werd dat dit abnormale eicellen waren (Wood *et al.*, 1981).

De resultaten zijn grosso modo in te delen in 2 groepen:

- Immunisatie waarbij pathologieën en veranderingen van de ovaria worden gezien (Sacco *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992; Rhim *et al.*, 1992; VandeVoort *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1996), zoals o.a. het geval is bij immunisatie met ZP3 (Bijlage 1).
- Studies waarbij de spermabinding en de fertiliteit geremd wordt zonder de follikelontwikkeling aan te tasten (Millar *et al.*, 1989; Aitken *et al.*, 1990; Sacco *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992; VandeVoort *et al.*, 1995). Dit wordt o.a. gezien bij immunisatie met ZP1 (Bijlage 1).

In bijlage 1 zijn de verschillende effecten van ZP-immunisatie bij de verschillende ZP-proteïnen weergegeven.

ALGEMEEN BESLUIT

Aangezien er veel studies gebeurd zijn op muizen is er in de literatuur vooral informatie te vinden over de ZP bij deze diersoort. Maar ook steeds meer informatie over andere diersoorten is beschikbaar, zoals het varken of de mens, waardoor species-verschillen aan het licht komen.

Er is al veel bekend over de ZP, maar toch zijn er nog veel dingen die onderzocht moeten worden of onduidelijk zijn. Zo zijn er bijvoorbeeld veel tegenstrijdigheden te vinden in de literatuur over de synthese-plaats van de ZPG's. Ook zijn er nog onduidelijkheden over de exacte invloed van de ZP op de oriëntatie van de blastocyst-as en hoe de receptor-inactivatie tijdens de zona-hardening precies in zijn werk gaat.

Maar zoals duidelijk is geworden in deze literatuurstudie is de ZP dus duidelijk méér dan een fysieke barrière tussen eicel en buitenwereld, met belangrijke functies zoals:

- Onderhouding van de communicatie tussen de granulosa-cellen en oöcyt tijdens de folliculogenese.
- Herkenning en binding van het sperma.
- Initiatie van de AR.
- De zona-hardening, ter vermindering van polyspermie.
- Bescherming van het preïmplantatie-embryo.
- Oriëntatie van de blastocyst-as.

BIJLAGEN

ZP family ¹	ZP protein	Function	Sperm receptor activity		Effect of ZP immunization		References
			native ZP	recombinant	native	recombinant	
ZP1	Mouse ZP1	Crosslinks ZP2 and ZP3	-	-	-	-	Greve and Wasserman [1985]
	Rabbit 55 kD	Sperm receptor	+	+	Normal follicular development	Inhibition of sperm binding/normal follicular development	Yamasaki et al. [1995] Vande Voort et al. [1995] Prasad et al. [1996b]
	Pig ZP3a/ZPB ²	Primary sperm receptor	+	ND	Normal follicular development	ND	Sacco et al. [1989] Yurewicz et al. [1993b] Jones et al. [1992]
	Human ZPB ²	Sperm receptor (inferred)	ND	ND	ND	ND	Vande Voort et al. [1995]
ZP2	Mouse ZP2	Secondary sperm receptor	-	-	ND	ND	Bleil et al. [1988]
	Rabbit ZP2	ND			ND	Ovarian pathology/no inhibition of sperm binding	Vande Voort et al. [1995]
	Pig ZP1/ZP2/ZPA ²	Secondary sperm receptor	-	-	Altered ovarian cyclicity	ND	Tsubamoto et al. [1996] Dunbar et al. [1989]
	Human ZP2/ZPA ²	ND					
ZP3	Mouse ZP3	Primary sperm receptor	+	+	Infertile/normal ovary; infertile ovarian oophoritis (inbred strain) when immunized with peptide		Millar et al. [1989] Lou and Tung [1993]
	Rabbit ZP3	Sperm binding	+	ND	Ovarian pathology	ND	Yamasaki et al. [1995] Lee et al. [1992]
	Pig ZP3b/ZPC ²	Sperm binding	+	ND	Infertile/ovarian pathology	ND	Yurewicz et al. [1993, 1998] Jones et al. [1992] Patterson et al. [1992]
	Human ZP3/ZPC ²	Sperm binding	ND	+	ND	Infertile/ovarian pathology	Van Duin et al. [1994] Barrat and Hornby [1995] Aitken et al. [1996]

Bijlage 1: Functies van de leden van de ZP-eiwitfamilies (uit Prasad et al., 2000).

ND= niet bepaald.

¹= ZP families zijn gebaseerd op de ZP nomenclature bij de muis.

²= Nomenclature zoals voorgesteld bij Harris et al. (1994).

Pathogen	Classification (family)	Size (diameter)	Remarks	Reference
Bovine viral diarrhea virus	Togaviridae	50~65nm	Injection into the uterine horns caused degeneration of bovine embryos	Archbald et al., 1979 ¹¹
Encephalomyocarditis virus (Mengo virus)	Picornaviridae	20~30nm	Penetrated the ZP and replicated in the 2-cell and morula-stage mouse embryos	Gwatkin, 1967 ²⁵¹
Sendai virus	Paramyxoviridae	100~300nm	Demonstrated in morula of infected mouse embryo	Tuffrey et al., 1972 ⁵²¹

Bijlage 2: Pathogenen die de ZP penetreren (uit Apelo en Kanagawa, 1989).

Pathogen	Classification (family)	Size (diameter)	Remarks	Reference
Bovine parvovirus	Parvoviridae	20 nm	No replication in zona-free bovine embryos	Bowen, 1979 ⁹¹⁾
Moloney sarcoma virus	Retroviridae	100~120 nm	Virus did not penetrate the ZP of mouse embryo	Baranska et al., 1971 ³¹⁾
Murine cytomegalo virus	Herpesviridae	100 nm	Particles beneath the ZP but no replication in mouse embryos	Neighbour, 1978 ²⁴⁾
Newcastle disease virus	Paramyxoviridae	70~180 nm	No infection of the zona-intact mouse embryos	Glass et al., 1974 ²⁴⁾
Porcine parvo virus	Parvoviridae	20 nm	No infection of porcine embryos	Wrathall and Mengeling, 1979a ⁵⁴⁾
Pseudorabies virus	Herpesviridae	100~150 nm	No infection of porcine zona-intact embryos	Bolin et al., 1979 ⁷⁾
Simian vacuolating virus	Papovaviridae	45 nm	Inner cell mass remained free of the virus in mouse embryos	Baranska et al., 1971 ³¹⁾

Bijlage 3: Pathogenen die de ZP niet kunnen penetreren (uit Apelo en Kanagawa, 1989).

Pathogen	Effect	Reference
Bovine leukemia virus	Zona-intact embryos from infected donors when properly washed do not transmit the virus	Hare et al., 1985 ²⁹⁾
Bluetongue virus	Assays and virus isolation were negative	Bowen et al., 1983 ¹¹⁾
Infectious bovine rhinotracheitis virus	Zona-intact embryos exposed to IBRV when washed and trypsin-treated do not transmit the disease	Singh et al., 1982b ⁴⁷⁾
Bovine viral diarrhea virus	Infectious virus was not isolated from any of the embryos exposed to BVDV	Singh et al., 1982a ⁴⁴⁾
Foot and mouth disease virus	Zona-intact embryos from infected donors when washed do not transmit the virus	McVicar et al., 1986 ³²⁾
<i>Brucella abortus</i>	Zona-intact infected embryos that are washed do not transmit the disease	Stringfellow et al., 1984 ⁴⁹⁾
Akabane virus	Zona-intact embryos unlikely to transmit the disease	Singh et al., 1982a ⁴⁴⁾
<i>Hemophilus somnus</i>	Zona-intact infected embryos, antibiotic-treated and washed will not transmit the disease	Kaneene et al., 1986 ³¹⁾
<i>Chlamydia psittacci</i>	No effect on embryo development when agent exposed via semen	Bowen et al., 1978a ¹³⁾

Bijlage 4: Pathogenen bij rundvee (uit Apelo en Kanagawa, 1989).

Pathogen	Effect	Reference
SWINE		
African swine fever	Virus adhered to the ZP	Singh et al., 1984 ³⁹⁾
Foot and mouth disease virus	Embryos exposed in vitro, 2~3% carried the virus	Singh et al., 1986 ⁴³⁾
Porcine parvovirus	Virus adhered to the ZP	Wrathall and Mengeling, 1979a ⁵⁴⁾
Hog cholera virus	No disease transmission	Dulac and Singh, 1988 ¹⁹⁾
Pseudorabies virus	Disease transmission occurred in some recipients	Bolin et al., 1982 ⁵⁾
Swine vesicular disease virus	Virus adhered to the ZP	Singh and Thomas, 1987a ⁴⁴⁾
Vesicular stomatitis virus	Virus adhered to the ZP	Singh and Thomas, 1987b ⁴⁵⁾
SHEEP and GOATS		
Bluetongue virus	Recipients became viremic	Gilbert et al., 1987 ²³⁾
Caprine arthritis-encephalitis virus	No virus recovery from offspring delivered from infected does	Wolfe et al., 1987 ⁵³⁾

Bijlage 5: Pathogenen bij varkens, schapen en geiten (uit Apelo en Kanagawa, 1989).

LITERATUURLIJST

1. Aerts J.M., Bols P.E. (2010). Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim* **45**, p. 171-179.
2. Aitken R.J., Paterson M., Praude P., Thillai-Koothan P. (1990). Evaluation of glycosylated and deglycosylated porcine zona antigens for contraceptive efficacy in vivo and in vitro. In Alexander N., Acosta A.A. (eds.): *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception*. New York, Wiley-Liss, p. 293-311.
3. Aitken R.J., Paterson M., van Duin M. (1996). The potential of the zona pellucida as a target for immunocontraception. *Am J Reprod Immunol* **35**, p. 175-180.
4. Alarcon V.B., Marikawa Y. (2003). Deviation of the blastocyst axis from the first cleavage plane does not affect the quality of mouse postimplantation development. *Biol. Reprod.* **69**, p. 1208.
5. Apelo C.L., Kanagawa H. (1989). Pathogens associated with mammalian embryo (A Review). *Japanese Journal of Veterinary Research* **37** (2), p. 49-69.
6. Archbald L.F., Fulton R.W., Seger C.L., Al-Bagdadi F., Godke R.A. (1979). Effect of bovine viral diarrhoea virus on preimplantation bovine embryos. A preliminary study. *Theriogenology* **11**, p. 81-89.
7. Aviles M., Martinez-Menarguez J.A., Castells M.T., Madrid J.F., Ballesta J. (1994). Cytochemical characterization of oligosaccharide chains of the glycoproteins of rat zona pellucida: an ultrastructural study. *Anat Rec* **239**, p. 137-149.
8. Baird D.T., Baker T.G., McNatty K.P., Neal P. (1975). Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle. *J. Reprod. Fert.* **45**, p. 611-619.
9. Baranska W., Konwinsky M., Kujawa M. (1975). Fine structure of the zona pellucida of unfertilized eggs and embryos. *J Exp Zool* **192**, p. 192-202.
10. Baranska W., Sawicki W., Koprowski H. (1971). Infection of mammalian unfertilized and fertilized ova with oncogenic viruses. *Nature* **230**, p. 591-592.
11. Barrat C.L., Hornby D.P. (1995). Induction of the human acrosome reaction by rhuZP3. In Fenichel P., Parinaud J. (eds.): *The Human Sperm Acrosome Reaction*. John Libbey Euro-text, Montrague, p. 105-122.
12. Bauskin A.R., Franken D.R., Eberspaecher U., Donner P. (1999). *Mol. Human Reprod.* **5**, p. 534-540.
13. Bedzhov I. (2009). Morpholinos. *аврѳт* **5**, 2009. Sclolar Google Internetreferentie:
http://www.google.nl/imgres?imgurl=http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mbo4/ch21f83.jpg&imgrefurl=http://bedzhov.wordpress.com/&usq=__S4-ImVWRzEWsKIFuX3laJtXFHk=&h=355&w=739&sz=46&hl=nl&start=0&zoom=0&tbnid=P-NLL6VwV0KH_M:&tbnh=68&tbnw=141&ei=ckVtTeChL8O7hAelmO2QDA&prev=/images%3Fq%3Dpreimplantation%2Bembryo%2Bzona%2Bpellucida%26hl%3Dnl%26biw%3D1362%26bih%3D517%26gbv%3D2%26tbs%3Disch:1&itbs=1&iact=hc&vpx=333&vpy=354&dur=141&hovh=68&hovw=141&tx=76&ty=98&oei=ckVtTeChL8O7hAelmO2QDA&page=1&ndsp=22&ved=1t:429,r:16,s:0 (geconsulteerd op 1 maart 2011).
14. Bielanski A., Dubuc C., Hare W.C., Myers D.J., Eaglesome M.D. (1992). Inactivation of viruses associated with bovine embryos using photosensitive agents. *Theriogenology* **38**, p. 633-644.
15. Bielanski A., Hare W.C. (1991). Investigation of some antimicrobial procedures on the in vitro development of early murine embryos aimed towards developing methods for the disinfection of mammalian embryos prior to transfer. *J In Vitro Fert & Embryo Transfer* **8**, p. 24-32.
16. Bleil J.D., Beall C.F., Wassarman P.M. (1981). Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev Biol* **86**, p. 189-97.
17. Bleil J.D., Greve J.M., Wassarman P.M. (1988). Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Developmental Biology* **128**, p. 376-385.
18. Bleil J.D., Wassarman P.M. (1980a). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* **76**, p. 185-202.
19. Bleil J.D., Wassarman P.M. (1980b). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**, p. 873-882.
20. Bleil J.D., Wassarman P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* **95**, p. 317-324.
21. Bleil J.D., Wassarman P.M. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* **102**, p. 1363-1371.
22. Boja E.S., Hoodbhoy T., Fales H.M., Dean J. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, p. 34189-202.
23. Bolin S.R., Runnels L.J., Sawyer C.A., Atcheson K.J., Gustafson D.P. (1979). Exposure of fertilized ova to pseudorabies virus. *Theriogenology* **11**, p. 92 (abstract).
24. Bolin S.R., Runnels L.J., Sawyer C.A., Gustafson D.P. (1982). Experimental transmission of pseudorabies virus in swine by embryo transfer. *Am. J. Vet. Res.* **43**, p. 278-280.
25. Bolin S.R., Turek J.J., Runnels L.J., Gustafson D.P. (1983). Pseudo-rabies virus, porcine parvovirus and porcine enterovirus interactions with zona pellucida of the porcine embryo. *Am. J. Vet. Res.* **44**, p. 1036-1039.
26. Bork P. (1993). A trefoil domain in the major rabbit zona pellucida protein. *Protein Sci* **2**, p. 669-670.
27. Bowen R.A. (1979). Viral infections of mammalian preimplantation embryos. *Theriogenology* **11**, p. 5-15.
28. Bowen R.A., Howard T.H., Elsdon R.P., Seidel G.E. (1983). Embryo transfer from cattle infected with bluetongue virus. *Am. J. Vet. Res.* **44**, p. 1625-1628.
29. Bowen R.A., Spears P., Storz J., Seidel G.E. (1978). Mechanism of infertility in genital tract infection due to *Chlamydia psittaci* transmitted through contaminated semen. *J. Infect. Dis.* **138**, p. 95-98.
30. Braden A.W., Austin C.R., David H.A. (1954). The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Aust. J. Biol. Sci.* **7**, p. 391-409.
31. Braun B.C., Ringleb J., Waurich R., Viertel D., Jewgenow K. (2009). Functional Role of Feline Zona Pellucida Protein 4 Trefoil Domain: A Sperm Receptor or Structural Component of the Domestic Cat Zona Pellucida? *Reprod Dom Anim* **44** (Suppl. 2), p. 234-238.
32. Braw-Tal R., Yossefi S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fert* **109**, p. 165-171.
33. Bronson R.A., McLaren A. (1970). Transfer to the Mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility* **22**, p. 129-137.
34. Burvenich C. (2008). *Fysiologie van de Huisdieren, Deel II: Fysiologie van de voortplanting & fysiologie van de melkklier*. Cursus Faculteit Diergeneeskunde, Gent, p. 329-336.

35. Byskov A.G. (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews* **66**, p. 71-117.
36. Calafell J.M., Nogues C., Ponsa M., Santalo J., Egozcue J. (1992). Zona pellucida surface of immature and in vitro matured mouse oocytes: analysis by scanning electron microscopy. *J Assist Reprod Genet* **9**, p. 365-372.
37. Callebaut I., Moron J.P., Monget P. (2007). *Bioinformatics* **23**, p. 1871-1874.
38. Conner S.J., Hughes D.C. (2003). Analysis of fish ZP1/ZPB homologous genes—evidence for both genome duplication and species-specific amplification models of evolution. *Reproduction* **126**, p. 347-352.
39. Darie C.C., Biniowski M.L., Jovine L., Litscher E.S., Wassarman P.M. (2004). *Biochemistry* **43**, p. 7459-78.
40. Darszon A., Liévano A., Beltran C. (1996). Ion channels: key elements in gamete signaling. *Curr Topics Dev Biol* **34**, p. 117-167.
41. Dean J. (2007). In *Gamete Biology* (Gupta S.K., Koyama K., Murray J.F., eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 359-365.
42. Dodson M.G., Minhas B.S., Curtis S.K., Palmer T.V., Robertson J.L. (1989). Spontaneous zona reaction in the mouse as a limiting factor for the time in which an oocyte may be fertilized. *J In Vitro Fert Embryo Transf* **6**, p. 101-106.
43. Dulac G.C., Singh E.L. (1988). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XII. The in vitro exposure of zona-intact porcine embryos to hog cholera virus. *Theriogenology* **29**, p. 1335-1341.
44. Dunbar B.S. (1990). Ovarian Antigens and Infertility. *Am J Reprod Immunol* **21**, p. 28-31.
45. Dunbar B.S., Avery S., Lee V., Prasad S.V., Schwahn D., Schwoebel E., Skinner S., Wilkins B. (1994). The mammalian zona pellucida: Its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. *Reprod Fertil Dev* **6**, p. 59-76.
46. Dunbar B.S., Bundman D.S. (1987). Evidence for a structural role of the major glycoprotein of the pig zona pellucida. *J Reprod Fertil* **81**, p. 363-376.
47. Dunbar B.S., Dudkewicz A., Bundman D.S. (1985). Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin. *Biol Reprod* **32**, p. 619-630.
48. Dunbar B.S., Lo C., Stevens V. (1989). Effect of immunization with purified porcine zona pellucida proteins on ovarian function in baboons. *Fertil Steril* **52**, p. 311-318.
49. Dunbar B.S., Wolgemuth D.J. (1984). Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. *Mod Cell Biol* **3**, p. 77-111.
50. East I.J., Gulyas B.J., Dean J. (1985). Monoclonal antibodies to the murine zona pellucida protein with sperm receptor activity: effects on fertilization and early development. *Developmental Biology* **109**, p. 268-273.
51. East I.J., Mattison D.R., Dean J. (1984). Monoclonal antibodies to the major protein of the murine zona pellucida: effects on fertilization and early development. *Developmental Biology* **104**, p. 49-56.
52. Emmen J.M., Couse J.F., Elmore S.A. *et al.* (2005). In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) α and ER β null mice indicate a role for ER β in follicular maturation. *Endocrinology* **146**, p. 2817-2826. [PubMed: 15731357].
53. Epifano O., Liang L., Dean J. (1995a). *J. Biol. Chem.* **270**, p. 27254-27258.
54. Epifano O., Liang L., Familiari M., Moos M.C., Dean J. (1995b). Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* **121**, p. 1947-1956.
55. Familiari G., Nottola S.A., Micara G., Aragona C., Motta P.M. (1989). Human in vitro fertilization: the fine three-dimensional architecture of the zona pellucida. *Prog Clin Biol Res* **296**, p. 335-344.
56. Familiari G., Relucanti M., Heyn R., Micara G., Correr S. (2006). Three-Dimensional Structure of the Zona Pellucida at Ovulation. *Microscopy research and technique* **69**, p. 415-426.
57. Florman H.M., Arnoult C., Kazam I.G., Li C., O'Toole C.M. (1998). A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* **59**, p. 12-16.
58. Fortune J.E., Kito S., Wandji S.A., Srsen V. (1998). Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. *Theriogenology* **49**, p. 441-449.
59. Fujimori T., Kurotaki Y., Miyazaki J., Nabeshima Y. (2003). *Development* **130**, p. 5113.
60. Gajhede M., Petersen T.N., Henriksen A., Petersen J.F., Dauter Z., Wilson K.S., Thim L. (1993). Pancreatic spasmodic polypeptide: First three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of proteins. *Structure* **1**, p. 253-262.
61. Gardner R.L. (2001). Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development* **128**, p. 839.
62. Gardner R.L. (2007). *Hum. Reprod.* **22**, p. 798.
63. Gardner A.J., Williams C.J., Evans J.P. (2007). Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: Evidence for calcium-dependent and -independent regulation. *Reproduction* **133**, p. 383-393.
64. Gilbert R.O., Coubrough R.I., Weiss K.E. (1987). The transmission of bluetongue virus by embryo transfer in sheep. *Theriogenology* **27**, p. 527-541.
65. Glass R.H., Calarco P.G., Lin T.P., Florence J., Oh J.O. (1974). Development of mouse blastocyst following injection with Newcastle disease virus. *Biol. Reprod.* **10**, p. 502-511.
66. Gougeon A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* **17**, p. 121-155.
67. Green D.P. (1997). Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod* **23**, p. 147-156.
68. Greve J.M., Salzman G.S., Roller R.J., Wassarman P.M. (1982). Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. *Cell* **31**, p. 749-759.
69. Greve J.M., Wassarman P.M. (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol.* **181**, p. 253-264.
70. Grootenhuys A.J., Philipsen H.L., de Breet-Grijpsbach J.T., van Duin M. (1996). Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J Reprod Fertil* **50** (suppl), p. 43-54.
71. Gwatkin R.B. (1967). Passage of Mengovirus through zona pellucida of the mouse morula. *J. Reprod. Fert.* **13**, p. 577-578.
72. Gwatkin R.B., Williams D.T., Carlo D.J. (1977). Immunization of mice with heat-solubilized hamster zonae: Production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Fertil. Steril.* **28**, p. 871-877.
73. Haines B.P., Rathjen P.D., Hope R.M., Whyatt L.M., Holland M.K., Breed W.G. (1999). Isolation and characterization of a cDNA encoding a zona pellucida protein ZPB from the marsupial *Trichsurus vulpecula* (brush-tail possum). *Mol Reprod Dev* **52**, p. 174-182.

74. Hansen H. (1992). Regulatory concerns regarding risk management in embryo transfer. Bull Office Int Epizooties, Paris. 104, p. 42.
75. Hare W.C. (1984). Embryo transfer and disease transmission (an overview). Proc. 10th Int. Cong. Anim Reprod. & Al., Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, IX, p. 1-9.
76. Hare W.C., Mitchell D., Singh E.L., Bouillant A.M., Eaglesome M.D., Ruckerbauer G.M., Bielanski A., Randall G.C. (1985). Embryo transfer in relation to bovine leukemia virus control and eradication. Can. Vet. J. 26, p. 231-234.
77. Harris J.D., Hibler D.W., Fontenot G.K., Hsu K.T., Yurewicz E.C., Sacco A.G. (1994). Cloning and characterization of zona pellucida gene and cDNAs from a variety of mammalian species. The ZPA, ZPB and ZPC gene families. DNA Sequence 4, p. 361-393.
78. Hasegawa A., Koyama K., Okazaki Y., Sugimoto M., Isojima S. (1994). Amino acid sequence of a porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 determined by peptide mapping and cDNA cloning. J Reprod Fert 100, p. 245-255.
79. Hedrick J.L., Wardrip N.J. (1987). On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. Dev Biol 121, p. 478-488.
80. Himelstein-Braw R., Byskov A-G., Peters H., Faber M. (1976). Follicular atresia in the infant human ovary. Journal of Reproduction and Fertility 46, p. 55-59.
81. Hirshfield A.N. (1991a). Development of follicles in the mammalian ovary. Internat Rev Cytol 124, p. 43-101.
82. Hirshfield A.N. (1991b). Theca cells may be present at the outset of follicular growth. Biology of Reproduction 44, p. 1157-1162.
83. Hsueh A.J., Billig H., Tsafirri A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr. Rev. 15, p. 1-18.
84. Hughes D.C., Barratt C.L. (1999). Biochim. Biophys. Acta 1447, p. 303-306.
85. Jackowski S., Dumont J.N. (1979). Surface Alterations of the Mouse Zona Pellucida and Ovum following in vivo Fertilization: Correlation with the Cell Cycle. Biology of reproduction 20, p. 150-161.
86. Jones G.R., Sacco A.G., Subramanian M.G., Kruger M., Zhang S., Yurewicz E.C., Moghissi K.S. (1992). Histology of ovaries of female rabbits immunized with deglycosylated zona pellucida macromolecules of pigs. J Reprod Fertil 95, p. 513-525.
87. Jovine L., Darie C.C., Litscher E.S., Wassarman P.M. (2005). Zona pellucida domain proteins. Annu. Rev. Biochem. 74, p. 83-114.
88. Jovine L., Litscher E.S., Wassarman P.M. (2002a). Egg zona pellucida, egg vitelline envelope, and related extracellular glycoproteins. Adv. Dev. Biol. Biochem. 12, p. 31-54.
89. Jovine L., Qi H., Williams Z., Litscher E.S., Wassarman P.M. (2002b). The ZP domain is a conserved module for protein polymerization. Nat Cell Biol 4, p. 457-61.
90. Jovine L., Qi H., Williams Z., Litscher E.S., Wassarman P.M. (2004). A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. Proc Natl Acad Sci USA 101, p. 5922-27.
91. [Jovine L.](#), [Qi H.](#), [Williams Z.](#), [Litscher E.S.](#), [Wassarman P.M.](#) (2007). Features that affect secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins during mammalian oogenesis. Soc Reprod Fertil Suppl. 63, p. 187-201.
92. Junqueira L.C., Carneiro J. (2007). In: *Funcionele histologie. Elfde, geheel herziene druk, Elsevier gezondheidszorg, Maarsse 2007 (Eerste druk: 1981)*, p. 618-626.
93. Kaipia A., Hsueh A.J. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. Annu Rev Physiol 59, p. 349-363.
94. Kaneene J.B., Coe P.H., Gibson C.D., Yamini B., Marinez R.O., Morrow D.A. (1986). The role of *Hemophilus somnus* in early embryonic death. I. The effect of the organism on embryos by dag 8 postbreeding. Theriogenology 26, p. 189-198.
95. Kaufman M.H., Fowler R.E., Barrat E., McDougall R.D. (1989). Ultrastructural and histochemical changes in the murine zona pellucid during the final stages of oocyte maturation prior to ovulation. Gamete Res 24, p. 35-48.
96. Kezele P., Skinner M.K. (2003). Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly. Endocrinology 144 (8), p. 3329-3337.
97. Kindon H., Pothoulakis C., Thim L., Lynch-Devaney K., Podolsky D.K. (1995). Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. Gastroenterology 109, p. 516-523.
98. Kirschhofer K., Kenyon J.B., Hoover D.M., Franz P., Weipoltshammer K., *et al.* (1998). Cytogenet. Cell Genet. 82, p. 126-30.
99. Kolle S., Sinowatz F., Boie G., Palma G. (1998). Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte and embryo. Mol Reprod Dev 49, p. 435-443.
100. Kurotaki Y., Hatta K., Nakao K., Nabeshima Y., Fujimori T. (2007). Blastocyst Axis Is Specified Independently of Early Cell Lineage But Aligns with the ZP Shape. Science vol 316, p. 719-723.
101. Lee V.H., Dunbar B.S. (1993). Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. Dev Biol 155, p. 371-382.
102. Lee V.J., Soch J., Dunbar B. (1992). Effect of immunization of zona pellucida (ZP) proteins on ovarian development in the guinea pig. Biol Reprod 46 (suppl 1), p. 321.
103. Lefievre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I.A., Monk M., Hughes D.C., Barratt C.L. (2004). Human Reprod. 19, p. 1580-1586.
104. Legan P., Rau K., Keen J.N., Richardson G.P. (1997). The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. J. Biol. Chem. 272, p. 8791-8801.
105. Lemercinier X., Muskett F.W., Cheeseman B., McIntosh P.B., Thim L., Carr M.D. (2001). High-resolution solution structure of human intestinal trefoil factor and functional insights from detailed structural comparisons with the other members of the trefoil family of mammalian cell motility factors. Biochemistry 40, p. 9552-9559.
106. Liang L., Dean J. (1993). Dev. Biol. 156, p. 399-408.
107. Lin Y., *et al.*, (1994). J. Cell. Biol. 125, p. 1157.
108. Litscher E.S., Qi H., Wassarman P.M. (1999). Biochemistry 38, p. 12280-12287.
109. Liu C., Litscher E.S., Mortillo S., Sakai Y., Kinloch R.A., Stewart C.L., Wassarman P.M. (1996). Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. Proceedings National Academy of Sciences USA 93, p. 5431-5436.
110. Llorca O., Trujillo A., Blanco F.J., Bernabeu C. (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. J Mol Biol 365, p. 694-705.
111. Lou Y., Tung K.S. (1993). T cell peptide of a self-protein elicits autoantibody to the protein antigen. Implications for specificity and pathogenetic role of antibody in autoimmunity. J Immunol 151, p. 5790-5799.

112. Loza Arredondo M.E. (1994). Role of embryonal steroidogenesis in early pregnancy. [Ginecol Obstet Mex.](#) 1994 Jan 62, p. 17-22.
113. Magoffin D.A., Erickson G.F. (1994). Control systems of theca-interstitial cells. *Molecular Biology of the Female Reproductive System*, p. 39-66. Ed. JK Findlay. Academic Press, San Diego, CA.
114. Mahi-Brown C.A., Yanagimachi R., Nelson M.L., Yanagimachi H., Palrimbo N. (1988). Ovarian histopathology of bitches immunized with porcine zonae pellucidae. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 10, p. 94-103.
115. Malette B., Paquette Y., Merlen Y., Bleau G. (1995). Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 41, p. 384-397.
116. Maresh G.A., Timmons T.M., Dunbar B.S. (1990). Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins. *Biol Reprod* 43, p. 965-976.
117. Marion G.B., Gier H.T. (1971). Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal. *J. Anim Sci* 1971; 32 (suppl 1), p. 24-47.
118. Mate K.E., McCartney C.A. (1998). Sequence and analysis of zona pellucida 2 cDNA ZP2 from a marsupial, the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *Mol Reprod Dev* 51, p. 322-329.
119. McCartney C.A., Mate K.E. (1999). Cloning and characterization of a zona pellucida 2 cDNA from a marsupial the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *Zygote* 7, p. 1-9.
120. McVicar J.W., Singh E.L., Mebus C.A., Hare W.C. (1986). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. VIII. Failure to detect foot and mouth disease viral infectivity associated with embryos collected from infected donor cattle. *Theriogenology* 26, p. 595-603.
121. Merchant-Larios H., Chimal-Monroy J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Prog Clin Biol Res* 296, p. 55-63.
122. Millar S.E., Chamow S.M., Baur A.W., Robey F., Dean J (1989). Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice. *Science* 146, p. 935-938.
123. Modlinski J.A. (1970). The role of the zona pellucida in the development of Mouse eggs in vivo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 23, p. 539-547.
124. Moreno-Pelayo M.A., del Castillo I., Villamar M., Romero L., Hernandez-Calvin F.J., *et al.* (2001). *J. Med. Genet.* 38, p. 13-16.
125. Mortillo S., Wassarman P.M. (1991). Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* 113, p. 141-151.
126. Motosugi N., Bauer T., Polanski Z., Solter D., Hiragi T. (2005). *Genes Dev.* 19, p. 1081.
127. Motta P.M., Van Blerkom J. (1975). A scanning electron microscopic study of the luteo-follicular complex. II. Events leading to ovulation. *Am J. Anat* 143, p. 241-263.
128. Neighbour P.A. (1978). Studies on the susceptibility of the mouse implantation embryo to infection with cytomegalovirus. *J. Reprod. Fert.* 54, p. 15-20.
129. Noden D.M., de Lahunta A. (1985). Derivates of the intermediate mesoderm: reproductive organs. Noden D.M., de Lahunta A. (eds.), *Embryology of Domestic Animals*. Williams & Wilkins, Baltimore, London, p. 322-327.
130. Noguchi S., Yonezawa N., Katsumata T., Hashimizu K., Kuwayama M., Hamano S., Watanabe S., Nakano M. (1994). Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim Biophys Acta* 1201, p. 7-14.
131. Nogues C., Ponsa M., Vidal F., Boada M., Egozcue J. (1988). Effects of aging on the zona pellucida surface of mouse oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 5, p. 225-229.
132. Oakberg E.F. (1979). Follicular growth and atresia in the mouse. *In Vitro* 15, p. 41-49.
133. Oktay K., Nugent D., Newton H., Salha O., Chatterjee P., Gosden R.G. (1997). Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and Sterility* 67, p. 481-486.
134. Oktem O., Oktay K. (2008a). Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1127, p. 20-26.
135. Oktem O., Oktay K. (2008b). The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci* 1127, p. 1-9.
136. O'Shaughnessy P.J., McLelland D., McBride M.W. (1997). Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. *Biology of Reproduction* 57, p. 602-608.
137. Otoi T., Tachikawa S., Kondo S., Susuki T. (1992). Effect of antibiotic treatment of in vitro fertilised embryos to remove adhering bacteria. *J Vet Med Sci* 54, p. 763-765.
138. Otoi T., Tachikawa S., Kondo S., Susuki T. (1993). Effect of washing, antibiotics and trypsin treatment of bovine embryos on the removal of adhering K99 *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci* 55, p. 1053-1055.
139. Paterson M., Thillai K., Morris K., O'Byrne K.T., Braude P., Williams A., Aitken R.J. (1992). Analysis of the contraceptive potential of antibodies against native and deglycosylated porcine ZP3 in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 46, p. 523-534.
140. Pepling M.E., Spradling A.C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125, p. 3323-3328.
141. Petersen T.N., Henriksen A., Gajhede M. (1996). Structure of porcine pancreatic spasmodic polypeptide at 1.95 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, p. 730-737.
142. Phillips D.M., Shalgi R.M. (1980a). Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucid. *J. Ultrastruct* 72, p. 1-12.
143. Phillips D.M., Shalgi R.M. (1980b). Surface properties of the zona pellucid. *J. Exp Zool* 213, p. 1-8.
144. Piotrowska K., Wianny F., Pedersen R.A., Zernicka-Goetz M. (2001). *Development* 128, p. 3739.
145. Piotrowska K., Zernicka-Goetz M. (2001). *Nature* 409, p. 517.
146. Piotrowska-Nitsche K., Zernicka-Goetz M. (2005). *Mech. Dev.* 122, p. 487.
147. Polshakov V.I., Williams M.A., Gargaro A.R., Frenkiel T.A., Westley B.R., Chadwick M.P., May F.E., Feeney J. (1997). High-resolution solution structure of human pNR-2/pS2: a single trefoil motif protein. *J Mol Biol* 267, p. 418-432.
148. Prasad S.V., Skinner S.M., Carino C., Wang N., Cartwright J., Dunbar B.S. (2000). Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* 166, p. 148-164.
149. Prasad. S.V., Wilkins B., Skinner S.M., Dunbar B.S. (1996). Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. *Mol Reprod Dev* 43, p. 519-529.
150. Qi H., Williams Z., Wassarman P.M. (2002). *Mol. Biol. Cell* 13, p. 530-541.
151. Rankin T., Dean J. (2000). The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction* 5, p. 114-121.

152. Rankin T., Familiari M., Lee E., Ginsberg A.M., Swyer N., Blanchette-Mackie J., Drago J., Westphal H., Dean J. (1996). Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zona pellucid and are infertile *Development* **122**, p. 2903-2910.
153. Rankin T.L., O'Brien M., Lee E., Wigglesworth K., Epig J., Jurrien D. (2001). Defective zonae pellucidae in ZP2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* **128**, p. 1119-1126.
154. Rankin T., Talbot P., Lee E., Dean J. (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss *Development* **126**, p. 3847-3855.
155. Rankin T., Tong Z-B., Castle P.E., Lee E., Gore-Langton R., Nelson L.M., Dean J. (1998). Human ZP3 restores fertility in ZP3-null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* **125**, p. 2415-2424.
156. Rasquin Victor., met bijdragen van Michel Asperges, Vik Casteels, Romain Decambray en Jean Van de Weerd. (2010). Biologielexicon. Sclolar Google Internetreferentie: <http://www.vob-ond.be/Biologielexicon/alfabetmap/O/oogenese.html> (geconsulteerd op 27 okt 2010).
157. Rhim S.H., Millar S.E., Robey F., Luo A.M., Yule T., Allen P., Dean J., Tung K.S. (1992). Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the Mouse zona pellucida. *J Clin Invest* **89**, p. 28-35.
158. Richards J.S., Jahnsen T., Hedin L., Lifka J., Ratoosh S., Durica J.M., Goldring N.B. (1987). Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* **43**, p. 231-276.
159. Riddell K.P., Stringfellow D.A., Gray B.W., Riddell M.G., Gallik P.K. (1994). Antibiotic treatment of bovine embryos. *J Assist Reprod & Genetics* **10**, p. 488-491.
160. Rohde R.F., Shulaw W.P., Hueston W.D., Bech-Nielsen S., Haibel G.K., Hoffsis G.F. (1990). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from washed bovine ova after in vitro exposure. *Am J vet Res* **51**, p. 708-710.
161. Roller R.J., Kinloch R.A., Hiraoka B.Y., Li S.S., Wassarman P.M. (1989). *Development (Camb.)* **106**, p. 251-261.
162. Rüsse I. (1983). Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* **24**, p.77-92.
163. Rüsse I., Sinowatz F. (1991). Gametogenese & Harn- und Geschlechtsorgane. Rüsse I., Sinowatz F. (eds.), *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, p. 51, 70 & 314.
164. Sacco A.G., Yurewicz E.C., Subramanian M.G., Matzat P.D. (1989). Porcine zona pellucida: Association of sperm receptor activity with the α -glycoprotein component (ZP3 α) of the Mr= 55,000 family (ZP3). *Biol Reprod* **41**, p. 523-532.
165. Sacco A.G., Yurewicz E.C., Subramanian M.G., Ye L., Dukelow W.R. (1991) Immunologic response and ovarian histology of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) immunized with porcine zona pellucida ZP3 (Mr=55,000) macromolecules. *Am J Primatol* **24**, p. 15-28.
166. Sclolar Google Internetreferentie. <http://www.jxmu.edu.cn/zupei/kejian/english/15.htm> (geconsulteerd op 14 maart 2011).
167. Senbon S., Hirao Y., Miyano T. (2003). Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev* **49**, p. 259-269.
168. Singh E.L. (1987). The disease control potential of embryos. *Theriogenology* **27**, p. 9-20.
169. Singh E.L., Dulac G.C., Hare W.C. (1984). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. V. The in vitro exposure of zona-intact porcine embryos to African swine fever virus. *Theriogenology* **22**, p. 693-700.
170. Singh E.L., Eaglesome M.D., Thomas F.C., Papp-Vid G., Hare W.C. (1982a). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to Akabane, bluetongue and bovine viral diarrhoea viruses. *Theriogenology* **17**, p. 473-444.
171. Singh E.L., McVicar J.W., Hare W.C., Mebus C.A. (1986). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. VII. The in vitro exposure of bovine and porcine embryos to foot and mouth disease virus. *Theriogenology* **26**, p. 587-593.
172. Singh E.L., Thomas F.C., Papp-Vid., Eaglesome M.D., Hare W.C. (1982b). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Theriogenology* **18**, p. 133-139.
173. Singh E.L., Thomas F.C. (1987a). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IX. The in vitro exposure of zona-intact porcine embryos to swine vesicular disease virus. *Theriogenology* **27**, p. 443-449.
174. Singh E.L., Thomas F.C. (1987b). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XI. The in vitro exposure of bovine and porcine embryos to vesicular stomatitis virus. *Theriogenology* **28**, p. 691-697.
175. Skinner S., Dunbar B. (1986). Species variation of the morphological, immunochemical, and biochemical properties of mammalian zonae pellucidae in Talwar P (ed.): *Fogarty Internation Center Meeting on Reproductive Immunity*. New York, Plenum Press, p. 251-268.
176. Skinner S.M., Mills T., Kirchick H.J., Dunbar B.S. (1990). Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology* **115**, p. 2418-2432.
177. Smitz J.E., Cortvrindt R.G. (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* **123**, p. 185-202.
178. Sokka T.A., Hamalainen T.M., Kaipia A., Warren D.W., Huhtaniemi I.T. (1996). Development of luteinizing hormone action in the perinatal rat ovary. *Biology of Reproduction* **55**, p. 663-670.
179. Spargo S.C., Hope R.M. (2003). Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol Reprod* **68**, p. 358-362.
180. Stringfellow D.A. (1998). Recommendation for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. (Eds. Stringfellow D.A., Seidel S.M.), p. 79-84.
181. Stringfellow D.A., Scanlan C.M., Brown R.R., Meadows G.B., Gray B.W., Young-White R.R. (1984). Culture of bovine embryos after in vitro culture to *Brucella abortus*. *Theriogenology* **21**, p. 1005-1013.
182. Stringfellow D.A., Seidel S.M. (eds.). (1990). *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 2nd edition, Champaign IL. IETS, 1990.
183. Thim L., May F.E. (2005). Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* **62**, p. 2956-2973.
184. Topper E.K., Kruijt L., Calvete J., Mann K., Topfer-Petersen E., Woelders H. (1997). Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* **46**, p. 344-350.
185. Tsubamoto H., Hadegeawa A., Inoue M., Yamasaki N., Koyama K. (1996). Binding of recombinant pig zona pellucida protein 1 (ZP1) to acrosome-reacted spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* **50**, p. 63-67.
186. Tuffrey M.M., Sizman B., Barnes R.D. (1972). Sendai virus infection of mouse eggs. *Br. J. Exp. Path.* **53**, p. 638-640.

187. VandeVoort C.A., Schwoebel E.D., Dunbar B.S. (1995). Immunization of monkeys with recombinant cDNA expressed zona pellucida proteins. *Fertil Steril* **64**, p. 838-847.
188. Van Duin M., Polman J., De Breet I., Ginneken K., Bunschoten H., Grootenhuys A., Brindle J., Aitken R.J. (1994). Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg interaction. *Biol Reprod* **51**, p. 607-617.
189. Van Soom A., Wrathall A.E., Herrier A., Nauwynck H.J. (2010). Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? *Reproduction, Fertility and Development* **22**, p. 21-31.
190. Verhoeven K., Van Laer L., Kirschhofer K., Legan P.K., Hughes D.C., *et al.* (1998). *Nat. Genet.* **19**, p. 60–62.
191. Visconti P.E., Galantino-Homer H., Moore G.D., Bailey J.L., Ning X., Fornes M., Kopf G.S. (1998). The Molecular Basis of Sperm Capacitation. *Journal of Andrology*. Vol **19**. No. 2. March/April, p. 242-248.
192. Von Weymarn N., Guggenheim R., Muller H. (1980). Surface characteristics of oocytes from juvenile mice as observed in the scanning electron microscope. *Anat Embryol (Berl)* **161**, p. 19-27.
193. Wassarman P.M. (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, p. 415-442.
194. Wassarman P.M. (1990a). Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil* **42**, p. 79-87.
195. Wassarman P.M. (1990b). Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* **108**, p. 1-17.
196. Wassarman P.M. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* **96**, p. 175-183.
197. Wassarman P.M. (2005). Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* **204**, p. 388-391.
198. Wassarman P.M. (2008). *Zona Pellucida Glycoproteins*. Published, JBC Papers in Press. June 6, 2008. DOI 10.1074/jbc.R800027200.
199. Wassarman P.M., Albertini D.F. (1994). Cellular and molecular biology of the mammalian ovum. In *The Physiology of Reproduction* **1**, p. 79-122. (Knobil E. and Neill J.D., eds.). Raven Press, New York, NY.
200. Wassarman P.M., Chen J., Cohen N., Litscher E., Liu C., Qi H., Williams Z. (1999). Structure and Function of the Mammalian Egg Zona Pellucida. *Journal of experimental zoology (mol dev evol)* **285**, p. 251-258.
201. Wassarman P.M., Greve J.M., Perona R.M., Roller J.R., Sulzman G.S. (1984). How mouse eggs put on and take off their extracellular coat. In: Davidson E.H., Firtel R.A., editors. *Molecular biology of development*. New York: Alan Liss, p. 213-225.
202. Wassarman P.M., Kinloch R.A. (1992). Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat Res* **296**, p. 3-15.
203. Wassarman P.M., Litscher E.S. (1995). Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr Top Dev Biol.* **30**, p. 1-19.
204. Wassarman P.M., Litscher E.S. (2008). Mammalian fertilization: the egg's multifunction zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, p. 665-676.
205. Williams Z., Wassarman P.M. (2001). *Biochemistry* **40**, p. 929-937.
206. Wolfe D.F., Nusbaum K.E., Lauerman L.H., Mysinger P.W., Riddell M.G., Putnam M.R., Shumway L.S., Powe T.A. (1987). Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus. *Theriogenology* **28**, p. 307-316.
207. Wolgemuth D.J., Celenza J., Bundman D.S., Dunbar B.S. (1984). Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev Biol* **106**, p. 1-14.
208. Wolpert L., Beddington R., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E., Smith J. (2002). In: *Principles of Development*. Second edition. Published in the United States by Oxford University Press Inc., New York, p. 439-444.
209. Wood D., Liu C., Dunbar B.S. (1981). The effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on fertility in rabbits. *Biol Reprod* **25**, p. 439-450.
210. Woodruff T.K., Shea L.D. (2007). The Role of the Extracellular Matrix in Ovarian Follicle Development. *Reprod. Sci.* **2007 December**; **14** (8 Suppl), p. 6-10.
211. Wrathall A.E., Mengeling W.L. (1979a). Effect of porcine parvovirus on the development of fertilized pig eggs in vitro. *Br. Vet. J.* **135**, p. 249-254.
212. Wrathall A.E., Mengeling W.L. (1979b). Effect of transferring parvovirus-infected fertilized pig eggs into seronegative gilts. *Br. Vet. J.* **135**, p. 255-261.
213. Yamasaki N., Riachardson R.T., O'Rand M.G. (1995). Expression of the rabbit sperm protein Sp17 in COS cells and interaction of recombinant Sp17 with the rabbit zona pellucida. *Mol Reprod Dev* **40**, p. 48-55.
214. Yanagimachi R. (1994). In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E., Neill J.D., Eds. (Raven, New York, 1994), p. 152-162.
215. Yonezawa N., Nakano M. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, p. 877–82.
216. Yurewicz E.C., Pack B.A., Armant D. R., Sacco A.G. (1993). Porcine zona pellucida ZP3 α glycol-protein mediates binding of the biotin-labeled M_r 55,000 family (ZP3) to boar sperm membrane vesicles. *Mol Reprod Dev* **36**, p. 382-389.
217. Yurewicz E.C., Sacco A.G., Gupta S.K., Xu N., Gage D.A. (1998). Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* **273**, p. 7488-7494.
218. Zeleznik A.J. (1993). Dynamics of primate follicular growth. A physiologic perspective. Adashi EY, Leung PCK (eds.), *The Ovary*. New York: Raven Press 1993, p. 41-55.
219. Zeleznik A.J., Kubik C.J. (1986). Ovarian responses in macaques to pulsatile infusion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone: increased sensitivity of the maturing follicle to FSH. *Endocrinology* **119**, p. 2025-2032.
220. Zhang F.P., Poutanen M., Wilbertz J., Huhtaniemi I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology* **15**, p. 172-183.
221. Zhao M., Gold L., Ginsberg A.M., Liang L.F., Dean J. (2002). *Mol. Cell. Biol.* **22**, p. 3111-3120.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2010- 2011

VERSLAG VAN DE DIERENARTSENSTAGE

door

Carlijne GOOSSENS

Stageverslag in het kader van de Masterproef

De auteur geeft de toelating deze studie als geheel voor consultatie beschikbaar te stellen voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van gegevens uit deze studie.

Het auteursrecht betreffende de gegevens vermeld in deze studie berust bij de promotor(en).

Het auteursrecht beperkt zich tot de wijze waarop de auteur de problematiek van het onderwerp heeft benaderd en neergeschreven. De auteur respecteert daarbij het oorspronkelijke auteursrecht van de individueel geciteerde studies en eventueel bijhorende documentatie, zoals tabellen en figuren.

De auteur is niet verantwoordelijk voor de behandelingen en eventuele doseringen die in deze studie geciteerd en beschreven zijn.

INHOUDSOPGAVE

1. STAGE GEZELSCHAPSDIEREN.....	1
1.1. LOGBOEK STAGE GEZELSCHAPSDIEREN.....	1
1.2. CASUÏSTIEK GEZELSCHAPSDIEREN.....	7
1.3. ANALYSE VAN STRUCTUUR EN MANAGEMENT PRAKTIJK GEZELSCHAPSDIEREN	11
2. STAGE GROTE HUISDIEREN	13
2.1. LOGBOEK STAGE GROTE HUISDIEREN.....	13
2.2. CASUÏSTIEK GROTE HUISDIEREN	17
2.3. ANALYSE VAN STRUCTUUR EN MANAEMENT PRAKTIJK GROTE HUISDIEREN	20
3. ALGEMENE REFLECTIE.....	22

1. STAGE GEZELSCHAPSDIEREN

1.1. LOGBOEK STAGE GEZELSCHAPSDIEREN

Logboek stage gezelschapsdieren

Datum stage: 19 juli t/m 23 juli 2010

Voor akkoord:

De stagemeester

Datum	Uur	Aard consultatie	Opmerkingen
19 jul. 10	8 uur	Doorverwezen patiënten/foto's bekijken, opgenomen patiënten nalopen	-Femurfractuur & heupluxatie -HD -Patiënt verdacht van Pemphigus vulgaris
	9 uur	Behandeling navelbreuk hond: Alg. OZ en voorbereiding narcose	Blijkt ook erge longontsteking met koorts te hebben → BAL (zie 10 uur)
	9.30	Algemeen OZ en voorbereiding op sterilisatie hond	(zie 11.30)
	9.40	Bloedafname voor progesterontest Hond (mogelijke dracht)	
	9.45	Vaccinatie hond	Kennelhoest
	10. uur	Operatie: Navelbreuk hond -Vorbereiding narcose (katheter Ed) -BAL -Behandeling navelbreuk	Complicaties tijdens BAL door erge slijmopgeving
	11 uur	Consultatie maligne lymfoma hond	
	11.30	Operatie: Sterilisatie hond	
	13 uur	Operatie: Uitvoering TTA bij hond met voorste kruisband ruptuur	
	13.45	Operatie: Arthroscopie schouder en elleboog hond	Verschillende fragmenten verwijderd

	15.00	Vaccinatie en Alg. OZ hond	Rabiës
	15.30	Aangereden hond: RX→Salter Harris fractuur Tibia	Besloten tot operatie
	16 uur	Hond verdacht van Pemphigus Vulgaris: -Biotname mond/neus -BloedOZ	
	16.45-17.15	Keizersnede	

Datum	Uur	Aard consultatie	Opmerkingen
20 jul. 10	8 uur	Hond met last aan de achterhand	-reflexen normaal -bloedOZ gedaan
	8.30	Opname-patient: -RX longen	-Erge longontsteking -koorts
	9 uur	Opname-patienten bekijken	
	9.30	SpermaOZ hond	-Microscopisch OZ -OZ via computer
	10 uur	Gebitscontrole -Moet evt. beugel	Door humane tandarts uitgevoerd
	10.15	Vaginoscopie en Bloedafname voor progesterontest hond	Besloten vandaag te bevruchten (zie 16 uur)
	10.30	Doofheidstest hond	BAER-test: Blijkt doof aan beide zijden
	11 uur	OZ hond; laten lopen/in auto springen	Verdacht van Myastenia Gravis
	11.30	Drachtdiagnose hond	Echo: 6 pups
	12 uur	Kat met verdikte onderlip	-Punctie; geen kwaadaardige cellen gevonden -Verdacht van astma door snelle AH
	12.30	Hond: -RX→Spondylosis -Echo→lets in maag?	

	13.15	Pauze	
	14 uur	Verwijdering hechtingen en controle wond hond	Vaccinatie Kennelhoest
	14.30	Wondcontrole hond	
	14.45	Operatie Uterusresectie (nav ontsteking) hond	Eierstoktumor ontdekt
	15.30	RX long bekijken	
	16 uur	Endoscopische KI en spermaOZ hond	
	16.30-17 uur	RX elleboog hond	LPC

Datum	Uur	Aard consultatie	Opmerkingen
21 jul. 10	8 uur	Opname-patienten verzorgen/onderzoeken	
	8.20	UrineOZ onder microscoop	Veel rbc's
	8.30	Alg. OZ hond met LCP	Methadon (voorbereiding narcose)
	9 uur	Hond: braken/diarree, afgevallen	
	9.30	Hond: RX buik	
	10 uur	Vaccinatie kat	Kattenziekte, niesziekte, ontwormpil
	10.15	Nagels knippen, anaalklieren leegmaken hond	
	10.30	Wondcontrole en schoonmaak hond	
	11 uur	Leptospirose en nagels knippen hond	
	11.15	Vaccinatie kitten	Kattenziekte, niesziekte
	11.30	Bloedafname voor progesterontest, vaginoscopie hond	
	12 uur	Gehoorgang en middenoor resectie hond	

	13 uur	Pauze	
	13.30	Vaccinatie katten	
	13.45	RX bekijken	
	14 uur	Vaccinatie hond	Cocktail
	14.15	Uitleg	
	14.45	Bloedafname voor progesterontest, vaginoscopie, swapname, hond	
	15 uur	Uitleg praktijk	
	15.15	Oogwond bekijken hond	Fluoresceïne-test
	15.30	Vaccinatie hond	Kennelhoest en kleine cocktail
	16 uur	RX buik hond	Blijkt niet verstopt
	16.30-18 uur	Euthanasie, Autopsie en leren hechten, hond	

Datum	Uur	Aard consultatie	Opmerkingen
22 jul. 10	8 uur	Opname-patienten bekijken/verzorgen	
	8.45	Alg. OZ verschillende patiënten	Methadon als voorbereiding narcose
	9 uur	Oorinspectie hond	Pseudomonas
	9.15	Operatie hond: Neusgaten verwijderen	
	9.30	Operatie hond: Sterilisatie	
	9.50	Operatie hond: Ooglidklier verwijderen	Cherry-eye
	10 uur	Aanleg katheter hond	
	10.30	Operatie hond: Myringotomie (gaatje maken in trommelvlies), wegnamen slijmvlieswoekeringen muil, gebitscontrole	- Tandsteen verwijderd - Tandem trekken
	12.15	Vaccinatie hond	Grote cocktail

	12.30	Voedselallergie en oorontsteking hond	
	13 uur	Pauze	
	13.45	Wondcontrole TTA hond	
	14 uur	Wondcontrole TTA hond	
	14.15	Hartecho hond	Persisterende Ductus Arteriosus (PDA)
	15.30	Vaginoscopie en Echo baarmoeder en eierstokken hond	
	16.15-16.30	Knobbel/gezwel en wondjes huid hond	

Datum	Uur	Aard consultatie	Opmerkingen
23 jul. 10	8 uur	Opnamepatiënten bekijken	Infuus aansluiten
	9.30	Hond: Looptest en reflexen achterpoot	
	10 uur	Hond: -Vaccinatie -OogOZ (juvenile folliculitis)	Kennelhoest, cocktail
	10.15	-Echo dracht hond -Echo baarmoederontsteking hond	
	10.45	Vaccinatie hond	Kennelhoest, Rabiës, cocktail
	11 uur	Gebitsreiniging hond	Verwijdering tandsteen en tand trekken
	11.20	Hond die blijft braken	Cerenia tegen centraal braken
	11.30	Hond: Oorontsteking	Oor kijken, spoelen, zalven
	11.45	Overleg opnamepatiënt	
	12.45	Pauze	
	13.30	-Hartecho hond -ECG -Vaginoscopie	

	14.15	Honden: -Echo drachtdiagnose -Vaccinatie -Nagels knippen	Parvo
	14.45	Hond: -Urineopvangen en UrineOZ -Echo blaas-prostaat- nieren	-Urine: veel struviet, rbc's, sperma -Prostaatcyste -Veel gas in darmen
	16 uur-17 uur	Operatie: Gebroken poot hond	

Voor akkoord:

de Stagemester

1.2. CASUÏSTIEK GEZELSCHAPSDIEREN

Voor mijn casus heb ik niet echt een eerstelijns-patiënt, omdat de kliniek vooral doorverwezen patiënten behandelt en het zeer moeilijk werd een totaal plaatje van een patiënt te verkrijgen.

Anamnese en Algemeen Onderzoek

Signalement:

Diersoort: Hond
Ras: Galgo
Geslacht: Mannelijk
Leeftijd: 1,5 jaar
Gewicht: 20 - 25KG

Reden van doorverwijzing:

Deze hond heeft ontstoken slijmvliezen en een opgezette keel waardoor hij wat kwijlt. Nu is de aandoening uitgebreid naar de neus. Hij heeft last van een vieze snotneus en de mucosa is aangetast. De hond is wat verzwakt en afgevallen aangezien hij door de ontsteking niet zo goed wil eten. De hond braakt niet, heeft weinig maar een normale ontlasting. Hij heeft ook geen koorts. De hond is een jaar geleden in het buitenland (Frankrijk) geweest. De eigen dierenarts is een behandeling gestart met AB en Prednison.

Probleemlijst:

Hieronder geef ik alle belangrijke symptomen weer.

- Stomatitis
- Anorexie, vermagerd
- Verzwakt
- Aantasting neus

Reeds ingestelde behandeling:

- 2x daags 1 ampul augmentin IV (=amoxiciline clavulaanzuur)
- 1x daags 1 tablet prednison 20 mg PO (bij stoppen prednison blijkt de ontsteking erger te worden en is er terugval met uitbreiding naar de neus)
- Ulcogant 3dd 5 ml PO (dit omdat oesophagitis wordt vermoed)
- Zantac 2x daags 1 ml IV (dit omdat oesophagitis wordt vermoed)
- Infuus (Ringer lactaat) 4 zakken per dag

Naar aanleiding van de uitbreiding naar de neus wordt er gedacht aan Pemphigus of Lupus. Dit is een auto-immuunziekte waarop het lichaam zichzelf gaat aanvallen.

Hierop word dan ook de diagnose toegespitst.

Diagnose:

-BloedOZ: Deze wordt in de kliniek zelf gedaan Het is een gewoon bloedOZ (lever, nier, ontstekingscellen), hier is echter niets uit gekomen. Daarna wordt er nog bloed afgenomen en opgestuurd naar het laboratorium voor een grondige analyse.

- Snaptest: Er wordt een snaptest gedaan om te kijken of de patiënt een ziekte heeft opgelopen toen hij in het buitenland was. Er wordt getest op: Borrelia, Anaplocephala, Ehrlichia. De uitkomst is negatief. Leishmania wordt aangevraagd.

- Biopsname orale en nasale mucosa: Er worden verschillende biopsen genomen van de wonden in de mond (onder andere aan de binnenkant lip) en van de neus (binnenkant en van de neusspiegel). Hierna worden de wonden goed gehecht. Biopsen worden in Formol gedaan en opgestuurd naar het laboratorium. Hierop wordt dan cytologisch en histologisch onderzoek gedaan.

- UrineOZ: Er wordt urine opgevangen en opgestuurd naar het laboratorium om eiwit te bepalen. Dit wordt gedaan om de nierfunctie te bepalen. Als er namelijk AG/AS complexen zijn kunnen deze vast komen te zitten in de nier, waardoor geleidelijk de nierfunctie uit kan vallen.

Differentiaal Diagnose:

-Stomatitis/ Oesophagitis door insectenbeet

Dit is echter onwaarschijnlijk omdat de behandeling niet aanslaat en omdat er nog verdere uitbreiding is opgetreden.

- Opname vreemde stof

Dit zou kunnen, maar de eigenaars hebben niets gezien en de andere hond die erbij loopt vertoont geen symptomen.

-Pemphigus

Dit is een auto-immuunziekte die onderverdeeld wordt in 4 categorieën: Vulgaris, Erythematosus, Vegetans, Follicularis

Naar aanleiding van de symptomen wordt er gedacht aan P. vulgaris. Hierbij wordt aangetast:

*Mondholte

*Mucocutane overgangen (lip- neus- oogleden- vulva- preputium- anale regio)

*Huid

De symptomen hierbij zijn: koorts
anorexia
lethargisch
pijn

Deze vorm heeft een zeer slechte prognose (Willemsse, 1991).

Dit komt vrij goed overeen met de bovenvermelde symptomen van de patiënt, uitgezonderd de koorts.

- Leishmania

Deze parasitaire ziekte wordt overgebracht door de zogenaamde 'sandflies'. Hiervoor werd preventief behandeld door de eigenaars, dus dit is niet erg waarschijnlijk

Ook zou bij deze ziekte de behandeling met prednison de symptomen hebben verergerd.

-Systemische lupus erythematosus (SLE)

Dit is een auto-immuunziekte.

Laesies: oren- lippen- neus- planum nasale- orale mucosale membranen

Verder heb je hierbij nog dikke gewrichten en koorts (Willemse, 1991).
Aangezien de patiënt geen dikke gewrichten heeft is deze ziekte niet erg waarschijnlijk.

- Erythema multiforme EM) – Toxic epidermal necrolysis (TEN)

Dit is een immuungemedieerde ziekte met een onderliggende systemische ziekte zoals hepatitis, systemische infectie, tumor, geneesmiddelen.

EM is de minder erge vorm van TEN. Het geeft aandoeningen van de huid en slijmvliezen.

In de meerderheid van de gevallen is de oorzaak onbekend

Symptomen EM: Voornamelijk de muceuze membranen zijn betrokken

TEN: Koorts, anorexie, muceuze membranen. Ook andere orgaansystemen zijn betrokken

Prognose is gereserveerd, vooral als de onderliggende ziekte niet wordt gevonden. 50% mortaliteit (Willemse, 1991).

Tabel 1. **Kenmerken van EM en SJS/TEN** (uit Bouwes Bavinck et al., 2005).

	EM	SJS/TEN
Huidafwijkingen	Typische schietschijflaesies of verheven atypische schietschijflaesies	Vlakke atypische schietschijflaesies, 'spots' (roodpaarse nauwelijks palpabele plaques), blaren
Distributie	Voorkeur voor distale delen van de extremiteiten; romp slechts in geringe mate aangedaan	Voorkeur voor de romp en meer proximale delen van de extremiteiten
Slijmvliesafwijkingen	Lippen en mondslijmvlies vaak aangedaan	Lippen en mondslijmvlies vrijwel altijd aangedaan
Uitgebreidheid	Meestal minder dan 10% lichaamsoppervlak	SJS tot 10% aangedaan SJS-TEN overlap 10-30% TEN meer dan 30%
Etiologie	Meestal viraal (herpesvirus, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>)	Meestal medicamenteus (sulfonamiden, antibiotica, antiepileptica, allopurinol)
Prognose	Uitstekend	Hoge morbiditeit en mortaliteit, sterk afhankelijk van uitgebreidheid.
Therapie	Symptoombestrijding	Symptoombestrijding, omgekeerd geïsoleerd verplegen, goede vochtbalans, experimenteel: intraveneuze immunoglobulines, dexamethasonpuls therapie.

Uitslag laboratorium:

Urineonderzoek: Er zijn veel ontstekingscellen in de urine gevonden. Dit kan o.a. kloppen met Pemphigus omdat de slijmvliezen van de urinewegen aangetast kunnen zijn.

Leishmania-test: Negatief

Biopname:

Uit de biopten is gebleken dat de hond *Erythema multiforme* heeft.

Nu word de onderliggende oorzaak opgespoord.

De hond heeft qua medicijngebruik enkel een ontwormings- pil gekregen wat hij ook al eerder heeft gebruikt.

Verdere diagnose voor oorzaak Erythema multiforme:

- RX Thorax: Geen bijzonderheden

- Echo hart: Geen endocarditis

- Echo buik: Geen bijzonderheden

- Lymfeknoop aangeprikt: Ln popliteus beeld van maligne lymfoom

Dit wordt naar een laboratorium opgestuurd voor definitieve diagnose en typering, aangezien dit de onderliggende oorzaak kan zijn van de Erythema.

Uitslag: Geen lymfoma

-ANA (antinucleaire antistoffen): Negatief

→Er is dus geen onderliggende oorzaak gevonden.

Behandeling:

-Prednison: om de afweer en dus de reactie op het eigen lichaam te onderdrukken. De dosis zal langzaam afgebouwd worden.

-AB: wordt niet meer gegeven aangezien de letsels zijn genezen.

Mogelijkheden en beperkingen van het werken onder praktijkomstandigheden:

Het werken onder praktijkomstandigheden heeft als grote voordeel dat je de patiënt goed kunt opvolgen. De patiënt word opgenomen en je kunt de hele dag kijken hoe het ermee gaat en of er veranderingen/verbeteringen zijn. Ook kun je snel ingrijpen of de medicatie veranderen als het de foute kant op dreigt te gaan met de patiënt. Dit is een groot voordeel, aangezien het vaak moeilijk is om een goede en volledige uitleg van de eigenaar te krijgen.

Een nadeel is dat je diagnostisch beperkt bent. Natuurlijk kun je zelf verschillende testen uitvoeren, maar grotendeels moet je materiaal opsturen naar het laboratorium en moet je een tijd wachten voordat je de uitslag krijgt. Deze uitslag kan voor sommige patiënten te laat komen en ondertussen moet je vaak toch al een behandeling instellen, ook al weet je bijvoorbeeld niet of een bacterie resistent is tegen de door jou gebruikte AB.

Referenties:

1. Willemse T. (1991). Clinical dermatology of dogs and cats: a guide to diagnosis and therapy. Lea en Febiger (publisher), Philadelphia (USA).
2. Bouwes Bavinck J.N., Lai A Fat E.J., Kardaun S.H., Kabel J., Diemont W. (2005). Klinisch beeld en oorzaken van erythema exsudativum multiforme, Stevens-Johnson-syndroom en toxische epidermale necrolyse, Nederlands tijdschrift voor dermatologie & venereologie, vol 15, p. 12-14.

1.3. ANALYSE VAN STRUCTUUR EN MANAGEMENT PRAKTIJK GEZELSCHAPSDIEREN

De kliniek is een groepspraktijk die bestaat uit een maatschap van 3 dierenartsen met 2 extra dierenartsen in loondienst en nog 6 dierenarts-assistenten. Het is een eerste- en vooral een tweedelijns praktijk met patiënten uit heel Nederland en ook uit België/Duitsland.

Eerst was het een groepspraktijk met 1 eigenaar en sinds kort is het een maatschap geworden met 3 eigenaren. Ze zijn van 8 tot 20 uur open.

De eigenaren werken minimaal 40 uur in de week, de andere dierenartsen hebben een parttime baan. Elk hebben ze hun eigen vaste dag waarop ze na werktijd oproepbaar zijn. Dan beantwoorden ze de telefoon en doen avond- en nachtdiensten. De weekenden worden onderling verdeeld. De nachtoppas: dit ligt er natuurlijk aan hoeveel opnamepatiënten er zijn en welke verzorging ze nodig hebben. Een van de eigenaars maakt de roosters. De weekenddiensten worden per half jaar gepland en de weekroosters ongeveer 2 maanden vooruit.

Ze maken gebruik van specifieke software, namelijk het programma Daisy.

Hiermee kun je onder andere:

- Afspraken maken
- Rekeningen maken en verzenden
- Het agendabeheer
- Patiënten opzoeken en patiëntenkaarten bekijken (Historische nota's vd patiënt)
- Interne mails sturen
- Medicijnstickers/etiketten maken
- Voorraadbeheer
- Bezoek/wachtkameroverzicht.

Hiermee wordt dus eigenlijk alles geregeld.

De kliniek is gericht op gezelschapsdieren en heeft een heel uitgebreid aanbod voor de klant.

Dit is allemaal te vinden op hun uitgebreide website.

Buiten alle standaardverrichtingen bieden ze onder andere aan:

- Een zeer brede groep van operaties
- BAER-test voor doofheid
- Endoscopie
- Vruchtbaarheid: Op dit gebied hebben ze veel ervaring met begeleiding, hormoonbepalingen in het bloed, vaginoscopie . Ook hebben ze een eigen Cryolab met alles wat daarbij komt kijken.
- Dermatologie
- Samenwerkingsverband met een humane tandarts (vullingen, beugels, wortelkanaalbehandelingen)
- Puppyparty
- Hartechodagen
- Konijnenspreekuur
- Nieuwsbrief
- Vuurwerkangst
- Ent-oproepen

- Slentrol-programma voor overgewicht.

Ze hebben een eigen 'laboratorium' met hierin:

- Spotchem: Biochemie van het bloed (serum: leverwaarden, totaal bilirubine etc.)
- Medonic: Hematologie van het bloed (wbc, rbc, ontstekingscellen %)
- Microscoop
- Kleuringen
- Centrifuge
- Immuline plus toestel = progesterontest
- Cryolab: afname van sperma, beoordeling spermakwaliteit (via speciaal computerprogramma) en het invriezen en verzenden van sperma (vers verdund en ingevroren).

Een zeer sterk punt van de praktijk vind ik het enorme aanbod voor de cliënten. Ze krijgen veel verschillende opties waaruit ze kunnen kiezen met de nodige begeleiding. Ook valt de wachttijd zeer goed mee voor de operaties, die in deze kliniek aan de lopende band worden gedaan.

2. STAGE GROTE HUISDIEREN

2.1. LOGBOEK STAGE GROTE HUISDIEREN

Datum stage: 20 september t/m 24 september 2010

Voor akkoord:

De stagemeeester

Datum	Uur	Aard bedrijfsbezoek	Opmerkingen
20 sep. 10	8.30	Uitleg stage en planning maken	
	9.30	Melkveebedrijf: -Vermoedelijke lebmaagkanteling	*Rectaal OZ *Temp-afname *Auscultatie (lichte steelband effect) *Behandeling: Lig-steek-rol
	10.30	Melkveebedrijf: -Drachtigheidsdiagnose -Vaginoscopie -Kalveren onthoornen	*Rectaal OZ *Verschillende koeien nog vuil→ Tochtig spuiten (zodat slijmproductie stijgt en al het vuil gaat weg)
	12.30	Uitleg en rondleiding op de praktijk zelf	
	13 uur	Pauze	
	14 uur	Varkensbedrijf: -Onderzoek klauwproblemen -Euthanasie verschillende zeugen/biggen	*Kreupel, navelbreuk
	16.30	Manege: -Vaccinatie paarden -Vaccinatie hond	*Tetanus en Influenza *Kleine cocktail
	17 uur	Einde	

Datum	Uur	Aard bedrijfsbezoek	Opmerkingen
21 sept.-10	8.30	Varkensbedrijf : -Zeugen -Gespeende biggen -Mestvarkens -Euthanasie verschillende varkens -Bedrijfsanalyse en – begeleiding met oa de voedervoorlichter	*Vaccineren (E. Coli en PRRS) *Drachtigheidsdiagnose met echo (scannen) *Verhoogde uitval; nalopen vd vers. Voeders, opvolging en samenstelling *Nalopen (grootte tomen, afwijkingen etc.) mestvarkens en de voeder/drinkinstallaties *T61, intracardiaal
	12.30	Pauze	
	13.15	Varkensbedrijf: -Zeugen -Kraamhokken -Bedrijfsanalyse en - begeleiding	*Scannen *Rectum-resectie *Nalopen (grootte tomen, afwijkingen etc.), kijken naar de voeder/drinkinstallaties
	16.30	Pluimveebedrijf: -Bloedafname kippen	* Uit vleugel
	18.15	Einde	

Datum	Uur	Aard bedrijfsbezoek	Opmerkingen
22 sep. 10	8.30	Rondleiding/ uitleg over het veterinair paardencentrum	Is onderdeel van hun praktijk
	9.15	Melkveebedrijf: -Vaccinatie kalveren	*Pinkengriep
	10 uur	Pauze	

	10.30	Melkveebedrijf: -Kalf met diarree	*Algemeen OZ (AH, T, P, turgor) *Infuus –vocht - bicarbonaat *NSAID's (meloxicam) *AB (enrofloxacin)
	11.45	Huisbezoek: -Paard met wonde	
	12.25	Melkveebedrijf: -Euthanasie koe	* T61, intraveneus
	13 uur	Melkveebedrijf: -Koe met uierontsteking	*Algemeen OZ *Uierinfuus *NSAID's
	14 uur	Melkveebedrijf: - Kalf met diarree	*Algemeen OZ *Infuus -vocht -bicarbonaat *NSAID's (meloxicam) *Diatrim
	15.45	Röntgen ondervoet paard	* Beginnende artrose
	16.45	Einde	

Datum	Uur	Aard bedrijfsbezoek	Opmerkingen
23 sep. 10	8.30	Aanvang stage	
	9.45	Manege: -Vaccinatie -Onderzoek merrie en veulen, verdacht van droes	*Rhinovirus
	10.45	Melkveebedrijf: -Koe met mastitis	* Mg/Ca-oplossing * Meloxicam
	11.30	Uitleg/demonstratie invoer gegevens in RX-works	Computerprogramma
	12 uur	In apotheek helpen	
	12.45	Pauze	
	13.30	Huisbezoek: -Paard met Moksymptomen	*OZ aangetaste plek

	14 uur	Manege: -Veulen - Echo Merrie	*Wonde bekijken *Bandage verschonen *Endometritis (veel vrij vocht) *Uterus spoelen
	15.30	Paard: -Hoornzuil verwijderen	
	17.15	Einde	

Datum	Uur	Aard bedrijfsbezoek	Opmerkingen
24 sept. 10	8.30	Melkveebedrijf: -Bedrijfsrondleiding -Bedrijfsbegeleiding -DrachtigheidsOZ	*Rectaal OZ
	11.15	In apotheek helpen	
	12.15	Pauze	
	13.00	Varkensbedrijf: -Kraamhokken -Zeugen - Mestvarkens -Bedrijfsanalyse en -begeleiding	*Nalopen van de verschillende afdelingen (ziekte, uitval, grootte tomen, afwijkingen etc.), kijken naar de voeder/drinkinstallaties * Euthanasie verschillende zieke dieren met T61 *Scannen *Vaccineren (PRRS, E. Coli) *Alles nalopen (ziekte, voeders etc.) * Alles nalopen (ziekte, voeders etc.)
	16.50	Einde	

Voor akkoord:

de Stagemeeester

2.2. CASUÏSTIEK GROTE HUISDIEREN

Anamnese

Signalement:

Diersoort: Rund

Ras: Holstein/MRY

Geslacht: Vrouwelijk

Leeftijd: Vaars, ongeveer 24-26 maanden oud, 6 weken geleden gekalfd

Probleem:

De koe startte zeer slecht op na de kalving, ze kwam niet op productie. De koe is wat mager, heeft een lage buikvulling en eet slecht.

→Vermoedelijke lebmaagkanteling.

Algemeen Onderzoek

- Ademhaling: Normaal
- Pols: 80
- Temperatuurafname: Temperatuur is 38,7 C, dit is iets lager als het optimale (38,8 C)
- Auscultatie: -Er is een Steelband-effect ("Ping-geluid") te horen, maar zeer zacht, onregelmatig en ook enkel aan de linkerkant. Rechts is niets te horen.
-Afwezigheid van borborygmen en pensgeluiden.
- Rectaal Onderzoek: Baarmoeder is mooi klein, de pens is slap.
- Verder is de vullingsgraad van de lebmaag zeer slap en zijn er geen penscontracties.

Uit dit onderzoek is gebleken dat de koe een lebmaagkanteling heeft, naar de linkerkant. De lebmaag is onder de pens doorgekapt. Er is maar zeer geringe gasvorming, waardoor de lebmaag niet onder spanning staat en ook zeer slap is.

Hoe ontstaat een lebmaagkanteling?

Een verplaatsing van de lebmaag is een gevolg van een verminderde lediging en de ophoping van gas in de lebmaag. Hierdoor wordt de lebmaag lichter dan de overige buikinhoud en kan hij gaan zweven. Er ontstaat dus eerst een lebmaagdilatatie en hierdoor kan een lebmaagkanteling ontstaan. Bij neerliggen/opstaan kan de lebmaag namelijk op een foute plaats terechtkomen. Meestal komt hij tussen de pens en de buikwand.

Een aantal factoren spelen een rol bij het ontstaan:

- Plots veel losse ruimte in de buik, bijvoorbeeld na een partus.
- Dieet: bijvoorbeeld een te zure inhoud (door veel brok opname) of een hoge concentratie aan vluchtige vetzuren. Dit heeft tot gevolg dat er stase is of een vertraging van de lediging van de lebmaag, wat een dilatatie tot gevolg heeft.
- Verminderde doorstroming van de maag/darminhoud, bijvoorbeeld bij kalfsziekte (Door het tekort aan calcium zijn er minder spiercontracties, waardoor er een dilatatie kan ontstaan.)

Vooraf na het afkalven zien we vaak een combinatie van deze factoren en kan lebmaagkanteling voorkomen (Deprez en van Loon, 2010; informatie van de dierenarts)

Differentiaal Diagnose

- Lebmaagkanteling: Dit is redelijk waarschijnlijk aangezien de koe pas gekalfd heeft, slecht eet, mager is en er pinggeluiden te horen zijn.
- Ruminitis: Dit is niet waarschijnlijk aangezien er weinig pinggeluiden te horen zijn. Bij de ontsteking zou je namelijk over de hele flank de geluiden moeten horen, wat hier niet het geval was.
- Abces: Hierbij zijn er pinggeluiden te horen. In dit geval is het niet waarschijnlijk omdat er niets van een zwelling te zien/voelen was (Deprez en van Loon, 2010).
- Acuut scherp (= scherp voorwerp door de netmaag in de buikholte)
- Hoflund-syndroom (= boek-/lebmaag verstopping) (informatie dierenarts).

Behandeling

We hebben hierbij drie opties bij een Lebmaag Links:

- Operatie: Hierbij maken we het dier open. De lebmaag wordt d.m.v. draden doorheen de lebmaag vastgezet aan de huid, op zijn oorspronkelijke plaats
- Endoscopische methode
- Lig-steek-rol

Hier werd er gekozen voor de zogenaamde Lig-steek-rol, die ik hieronder verder zal bespreken.

Lig-steek-rol:

- Sedatie van de koe
- De koe wordt met behulp van touwen op zijn zij getrokken
- Scheren
- De koe wordt op zijn rug getrokken
- Met een trocar wordt in de lebmaag geprikt op 2 verschillende plaatsen. Meteen wordt er geluisterd en geroken of er gas vrijkomt. Met draden wordt de lebmaag vastgemaakt aan de huid, zodat hij weer op de oorspronkelijke plaats terechtkomt. Door de touwtjes wordt er een lichte peritonitis veroorzaakt, wat zorgt voor een vergroeiing waardoor de lebmaag (meestal) op zijn plaats zal blijven.
- Daarna worden de touwtjes vastgezet
- De koe krijgt nog:
 - * Glucose infuus voor energie
 - * Propyleenglycol: Dit is voor de gluconeogenese en het op gang brengen van de vertering.
 - * Voreen: Dit is een glucocorticosteroid wat de vertering stimuleert en tevens ontstekingsremmend werkt.
 - * Bovi C3: Dit is bicarbonaat om de pensfunctie te verhogen (om zo de pensverzuring op te heffen die is ontstaan door het krijgen van enkel brok of stilvallen van de peristaltiek.)
- Verder moet er worden gezorgd voor meer structuur (hooi) in het rantsoen en minder brok. (informatie van de dierenarts)

Mogelijkheden en beperkingen van het werken onder bedrijfsomstandigheden

Bij de landbouwhuisdieren sector ben je meer beperkt als bij gezelschapsdieren.

In de GHD sector ga je namelijk van bedrijf tot bedrijf en moet je alle spullen, die je nodig denkt te hebben, bij je hebben. Het kan natuurlijk voorkomen dat je een keer iets vergeet mee te nemen of dat er geen plaats meer is in je auto. Zo kun je een kreupel paard al wel onderzoeken door hem te laten draven/stappen, palperen etc., maar een röntgenfoto kun je niet ter plaatse maken. Deze dieren zullen dan nog naar de praktijk toe moeten komen waar deze materialen wel ter beschikking zijn.

Ook kan het gewicht van de dieren een probleem zijn. De landbouwhuisdieren zijn namelijk veel zwaarder. Hierdoor moet je zelf al wat sterker zijn om bepaalde onderzoeks- of behandelmethoden toe te passen en vaak komt hulp van de boer zeer goed van pas.

2.3. ANALYSE VAN STRUCTUUR EN MANAEMENT PRAKTIJK GROTE HUISDIEREN

Deze praktijk is een grote groepspraktijk die alle diersoorten omvat. Binnen de praktijk zijn er 15 dierenartsen. Vijf dierenartsen hiervan verlenen de zorg aan de gezelschapsdieren en de andere tien zijn werkzaam in 1 tot 2 andere diersoorten. Van deze dierenartsen behoren er 8 tot de Maatschap en 7 zijn er in loondienst. Dit alles is verder onderverdeeld in diersoortcommissies. Zij stellen jaarplannen op voor hun eigen diersoort en leggen verantwoording af aan de Maatschap.

Uiteraard draait de praktijk niet alleen op dierenartsen. Er zijn 27 personen werkzaam ter ondersteuning van de dierenartsen bij hun dagelijkse werkzaamheden. Hiertoe behoren onder andere mensen voor het apotheekbeheer, administratie, telefonistes, laboranten en paraveterinair.

Ze hebben een afdeling voor gezelschapsdieren die bestaat uit 3 klinieken, verspreid over verschillende locaties. Met behulp van moderne apparatuur (Digitale röntgenologie, echografie, gasanesthesie en endoscopie) wordt er goede diergeneeskundige zorg aangeboden. Deze dierenartsen houden zich uitsluitend bezig met gezelschapsdieren.

Naast gezelschapsdieren hebben ze ook dierenartsen voor de landbouwhuisdieren, namelijk pluimvee-, varkens- en herkauwerdierenartsen.

Dan hebben ze ook nog een paardenkliniek waar diverse operaties, onderzoeken en behandelingen, zoals bijvoorbeeld een gebitsbehandeling, kunnen worden uitgevoerd. Een team van drie dierenartsen met assistente verzorgt de werkzaamheden.

Daarnaast heeft men nog een eigen laboratorium. Deze vervult een zeer belangrijke rol binnen de praktijk, maar ook daarbuiten. Ook een apotheek en sectiezaal behoren tot de praktijk.

Men maakt gebruik van specifieke software, namelijk het programma RX-works.

Hiermee kun je onder andere:

- Afspraken maken
- Rekeningen maken
- Agenda beheren
- Bedrijven en patiënten opzoeken en bedrijfsgeschiedenis/ patiëntenkaarten bekijken (Historische nota's van de patiënt)

Voor de avond-, nacht- en weekenddiensten heeft de landbouwhuisdieren-afdeling een samenwerkingsverband met een nabij gelegen dorpje. Er wordt een roulerend schema toegepast. Voorlopig heeft de praktijk geen extra toekomstplannen. Dit aangezien ze net enkele fusies achter de rug hebben en zo de afgelopen jaren zeer sterk gegroeid zijn.

Men biedt ook specifieke activiteiten aan aan het cliënteel.

Zo hebben ze;

- Een grote en uitgebreide website, waarop alles over de praktijk en medewerkers is te vinden. Ook zijn alle diersoorten geklasseerd en is er per diersoort van alles te vinden. Bij kat kun je bijvoorbeeld de volgende onderwerpen bekijken:
 - * Aanschaf
 - * Gedrag, opvoeding
 - * Verzorging

- * Vaccinatie
- * Vakantie, chippen
- * Voortplanting, sterilisatie en castratie
- * Operaties, narcose
- * Spoed
- * De oudere kat
- * Virusziekten
- * Aanvullend onderzoek
- * Euthanasie
- Voor paarden wordt er een jaarlijkse lezing gehouden
- Bij de gezelschapsdieren worden er verschillende infosessies gegeven zoals;
 - * Puppy-spreekuur
 - * Kittenparty
 - * Gedragsproblemen

Zwakke punten aan deze praktijk ben ik niet tegengekomen. Dit komt denk ik omdat ik vaak mee naar de boeren was en maar een week heb meegelopen zodat ik niet alles heb gezien.

Sterke punten vind ik het grote aanbod voor de klant. Je kunt er echt met al je diersoorten terecht (wat zeer gemakkelijk is) en daarenboven heb je per diersoort nog een zeer uitgebreid aanbod aan informatie. Ook zijn er meerdere dierenartsen per diersoort, wat ik een zeer groot voordeel vind zodat er altijd nog onderlinge communicatie en overleg mogelijk is bij twijfel.

Referenties:

1. Deprez P., van Loon G. (2010). Inwendige ziekten van de grote huisdieren. Cursus Faculteit Diergeneeskunde, Gent, p. 90-95.

2. Informatie gegeven door de dierenarts.

3. ALGEMENE REFLECTIE

Beide stages hebben me een goede indruk gegeven over hoe het er nu echt in de praktijk aan toe gaat. Eerst zal ik mijn ervaringen en indrukken over mijn eerste stage vertellen, de gezelschapsdierenpraktijk. Daarna de stage bij de landbouwhuisdierenpraktijk.

Gezelschapsdierenpraktijk:

Hier viel ik meteen op een zeer drukke dag binnen. Hier heb ik dan ook een grote verscheidenheid aan operaties, consultaties en behandelingen gezien. Van simpele injecties en bloedafnames tot een ingewikkelde operatie bij een hond met een voorste kruisband ruptuur.

Wat ik heel leuk vond is dat je zoveel dingen tegen komt die je hebt gezien in het lesmateriaal van de voorbijgaande jaren. Op deze praktijk werden bijvoorbeeld aan de lopende band vaginoscopische onderzoeken gedaan om te kijken of een hond gedekt kon worden. Hierdoor leer je beetje bij beetje welke zaken en onderwerpen veel toegepast worden in de praktijk en welke meer als achtergrond-informatie dienen.

Ook zie je in zo'n stageweek dat het niet alleen maar consultaties zijn en 'diertjes beter maken'. Je leert en ziet dat een groot deel van de tijd bestaat uit opgenomen patiënten bekijken, mensen nabellen, informatie opzoeken of navragen en dergelijke.

In deze praktijk heb ik redelijk wat ervaring op gedaan. Voornamelijk kennis, en dan vooral omdat dingen die je geleerd hebt, in de praktijk ziet. Hierdoor heb je herhaling en zie je het echt voor je gebeuren, waardoor je alles beter onthoudt. Qua vaardigheden heb ik helaas niet zo heel veel geleerd. Dit omdat ik niet veel zelf mocht doen.

Deze kliniek is een groepspraktijk, wat me zelf heel veel aanspreekt. Hierdoor heb je altijd de mogelijkheid om verscheidene zaken te overleggen met een collega of te informeren als je er zelf niet helemaal uit komt. Je kunt altijd vragen naar een 2^e opinie. Dit geeft toch wat meer vertrouwen, je hebt namelijk iets om op terug te vallen. Dit lijkt me zeer fijn, vooral als je net bent afgestudeerd en nog veel zaken moet leren.

Nog een voordeel is dat je vaak een groter aanbod hebt voor de klanten. Zo zijn er vaak infosessies en een groter aanbod aan zorg en operaties die uitgevoerd kunnen worden, puur omdat je met meer mensen bent. Verder is er een betere begeleiding mogelijk van de patiënten. Ook denk ik dat je als klant meer gerust bent omdat je weet dat je dierenarts de mogelijkheid heeft tot overleg met de collega's en er zo aan alles gedacht wordt, vooral wanneer het een moeilijk geval betreft.

Natuurlijk is een groepspraktijk ook fijn voor de avond-, nacht-, en weekenddiensten. Omdat je met meer mensen bent kun je dit onder iedereen verdelen, in tegenstelling dat je zelf altijd paraat moet staan als je een eenmanspraktijk hebt. Ook zal het gemakkelijker zijn om bijvoorbeeld vakanties te plannen.

Landbouwhuisdierenpraktijk:

In deze praktijk heb ik een zeer goed beeld gekregen hoe de landbouwhuisdieren-sector in elkaar zit. Ik ben meegeweest naar de boeren toe, op veel verschillende bedrijven. Zo heb ik verscheidene soorten varkensbedrijven gezien, waaronder enkele oude en ook een gloednieuwe stal. Bij deze laatste was alles qua hygiëne al veel verder gevorderd en moest er eerst gedoucht worden en bedrijfskledij aangetrokken worden voordat je de stallen binnen mocht. Ook was er 1 groepshuisvesting bij voor de zeugen, waar alle zeugen vrij door elkaar liepen en er ook verschillende 'speelballen' waren tegen de verveling. Dit vond ik vanuit ethisch standpunt al veel prettiger om te zien dan de kleine hokjes bij de andere bedrijven. Verder heb ik nog een pluimveebedrijf, verschillende

melkveebedrijven en maneges gezien.

Wat me vooral verraste is het feit dat je zo lang bezig bent op een bedrijf. Ik had verwacht dat je, inclusief reistijd, meer bedrijven op een dag zou kunnen bezoeken. Bij deze stage hebben we meestal twee bedrijven per ochtend of middag gedaan, soms zelfs maar een als het een varkensbedrijf betrof. Allereerst moet je naar het bedrijf toe rijden, wat soms wel een half uur of langer is, afhankelijk van de grootte van de cliëntenkring. Op het bedrijf zelf komt er ook veel meer bij kijken dan ik verwacht had. Natuurlijk wist ik wel dat bedrijfsbegeleiding in deze sector zeer belangrijk was, maar dat op een varkensbedrijf echt alle hokken werden nagelopen wist ik niet. De hokken werden 'gescreend' het algemeen uitzicht/grootte van de dieren en ziekte, en ook de voeder- en drenksystemen werden nagelopen. Dit alles natuurlijk terwijl de algemene stand van zaken op het bedrijf bij de boer werd gepeild. Verder ben je per bedrijf nog eens veel tijd kwijt omdat er, buiten dat alles moet worden nagelopen, hygiënische maatregelen moeten worden getroffen zoals; bedrijfschoeisel, een overall of bedrijfskledij en eventueel een douche.

Deze zaken zijn dus wel een nadeel van deze sector en zorgen ervoor dat je minder productieve tijd hebt.

Deze stage heeft me zeker kennis en vaardigheden bijgebracht. Ook hier weer omdat je zaken die je geleerd hebt nu echt in de praktijk ziet en ook mag doen. Qua vaardigheden heb ik bij deze stage meer geleerd als bij de gezelschapsdierenpraktijk. Hier lieten ze me de dingen uitgebreider zien en ook mocht ik zelf meer doen. Zo heb ik verschillende koeien mogen opvoelen. Hier had ik best veel moeite mee en ik voelde niet zo heel veel of beter, ik wist niet precies wat ik nu allemaal voelde. Ook heb ik zelf bloed mogen nemen bij pluimvee (uit de vleugel), een katheter mee ingebracht bij een kalf, IM en SC-injecties gegeven en ook nog een koe ge-euthanaseerd. Ik vond het erg interessant en leuk dat ik dit allemaal zelf mocht doen, want het zien gebeuren is toch heel wat anders als het zelf te moeten doen.

Net zoals de gezelschapsdierenpraktijk was ook deze praktijk een groepspraktijk. De praktijk omvat alle diersoorten (inclusief gezelschapsdieren) en voor elke diersoort is er 1 of 2 of zelfs meerdere dierenartsen. De voordelen van deze groepspraktijk zijn dezelfde als hierboven.

Mijn vaardigheden:

Mijn eigen praktijkvaardigheden zijn nog summier. Aangezien we op school nog niet veel praktijkervaring opdeden, zoals zelf een infuus of een katheter aanleggen. Maar door het meerdere malen herhalen (eventueel met begeleiding) zal ik straks de vaardigheden onthouden en helemaal zelfstandig kunnen uitvoeren.

Ook qua kennis merk ik dat ik wat moeite heb. Het omzetten van de theoretische kennis naar de praktijk is niet altijd gemakkelijk uit de grote hoop kennis die we de afgelopen jaren hebben vergaard. En als je dan het antwoord hoort denk je, 'ach ja'. Bijvoorbeeld om een differentieel diagnose op te stellen of als er in de les of in de klinieken iets qua kennis gevraagd wordt.

Mijn visie:

Beide praktijken hebben veel indruk op me gemaakt en waren zeer interessant en hebben ze me veel geleerd over hoe het er in werkelijkheid aan toegaat.

De landbouwhuisdierenstage heeft mijn vermoeden bevestigd dat ik later zeker niet in de varkens- of pluimveesector wil werken, hoe groot de vraag naar deze dierenartsen ook is. Deze sectoren zijn me

te 'industrieel'. Het feit dat hier het individuele dier niet meer centraal staat, maar wel de groep en met name de prestaties die geleverd moeten worden, trekt me niet aan. Allereerst kan ik me niet vinden met de manier waarop deze diersoorten gehuisvest worden. Als ik in een varkens- of kippenstal kom ben ik niet op mijn gemak. Het is niet zo dat ik deze dieren echt zielig vind, want ik weet wel dat ze het niet zo heel slecht hebben en dat er tegenwoordig vanuit ethisch standpunt alles gedaan wordt om de dieren beter te huisvesten. Maar toch voel ik me ongemakkelijk wanneer ik 20.000 kippen op elkaar gepropt in een stal zie zitten. Of wanneer ik in de kraamstal sta bij een zeug met haar biggen, terwijl ze enkel kan staan, zitten of liggen. Niet in staat om een nest voor hen te bouwen of met haar kroost te spelen. Dan vind ik het toch veel aangenamer om een koe op de wei te zien staan. Verder vind ik het jammer dat hier het individuele dier geen kans meer krijgt. Een kreupele big wordt onbehandeld verbannen tot de ziekenboeg om daar zijn tijd uit te zitten om te eindigen als speenvarken. Natuurlijk snap ik het standpunt van de boer, en ik snap heel goed dat het economisch niet rendabel is om zo'n beest te behandelen. Maar zelf zou ik er geen vrede mee hebben. Ik heb geen 6 jaar gestudeerd om een dier dat ik beter kan maken, te moeten afmaken om een loutere € 10,-. Om deze redenen denk ik dat het beter is dat ik niet voor deze twee sectoren kies.

Optie paard valt ook af voor mij. Paarden vind ik mooie en leuke dieren, maar ik vind dat ik er te weinig kennis voor heb. Ik heb wel ooit een keer paard gereden, maar daar houdt het ook bij op. Iemand die zijn hele leven al rijdt en in de paardenwereld zit heeft veel meer kennis over dit dier. Dit zal je ook hard nodig hebben en ik denk dat je als 'leek' snel door de mand zal vallen en niet echt serieus wordt genomen.

Optie Rund (en KHK) en Kleine Huisdieren spreekt mij beide aan.

Ik wil in ieder geval zeker gezelschapsdieren gaan doen. Dit omdat ik vanuit thuis deze diersoorten meer gewend ben, aangezien ik niet van een boerderij kom. Hier stap ik vertrouwd en zelfverzekerd naar een dier toe, in tegenstelling tot een paard of varken. Natuurlijk is in deze sector het 'aibaarheids-gehalte' hoog, wat ik leuk vind, maar hier staat in ieder geval het individuele dier nog centraal. Je mag hier echt dieren behandelen en de mensen hebben er nog geld voor over om een dier beter te maken. Dit is altijd vanuit mijn jeugd al mijn droom geweest: Dieren beter maken.

Vandaar dat ik denk dat gezelschapsdieren de goede keuze voor mij zijn.

Toch ben ik ook aan het twijfelen over rund. Ik vind koeien, schapen en geiten echt hele leuke dieren. Omdat ik hiermee nog niet zo vertrouwd was, heb ik enkele malen bij een vriendin (die thuis een melkveebedrijf hebben) meegeholpen bij het melken. Ook ben ik naar Noorwegen geweest om hier 2,5 week mee te helpen op een melkveebedrijf. Nu ben ik dus al meer vertrouwd met deze diersoort, en wat ik gezien heb tijdens mijn landbouwhuisdierenstage bij rund, sprak me ook erg aan. Dit mede omdat hier toch nog wel een beetje gekeken wordt naar het individuele dier, maar ook omdat ik heel het concept van het contact met de boer en het in de stal zijn tussen de beesten erg leuk vind. Maar in deze sector heb je nadeel als je vrouw bent, wat me toch wat afschrikt. Boeren kijken er nog wat sceptisch tegenaan, waardoor je je extra moet bewijzen. En natuurlijk heb je veel kracht nodig en doorzettingsvermogen nodig.

Om deze redenen ga ik waarschijnlijk kiezen voor gezelschapsdieren. Maar toch hoop ik later deze twee sectoren te combineren. Misschien dat ik nog een extra jaar doe om optie rund goed te leren, of dat ik deze vaardigheden na het afstuderen leer door met een dierenarts mee te gaan. Maar tijdens mijn laatste stage is het me wel duidelijk geworden dat het steeds moeilijker is om deze 2 diersoorten te combineren. Het wordt steeds meer diersoort gericht en de praktijken worden ook steeds gespecialiseerder. Ik kan alleen maar hopen dat er voor mij later een plekje zal zijn in beide sectoren.