

ONDERZOEK AAN VAGINA-UITSTRIJKJES
VAN DE GEWONE ZEEHOND

Jaap van der Toorn

R.U. Groningen
doctoraalverslag
Vakgroep Zoölogie
Prof.dr. R.H. Drent

Rijksinstituut voor
Natuurbeheer
Texel
afd. Zoölogie
projectleider
Dr. P.J.H. Reijnders

1984

196918

~~RIJKSINSTITUUT VOOR NATUURBEHEER~~
VESTIGING TEXEL
Postbus 59, 1790 AB Den Burg, Texel
tel. 02226 - 343

Overneming van gegevens is alleen
toegestaan na overleg met de projectleider

Rijksinstituut voor Natuurbeheer
Texel

I N H O U D S O P G A V E

Hoofdstuk	Pagina
1 INLEIDING	1
2 HISTOLOGISCH ONDERZOEK	3
2.1 CELTYPEN EN VERWERKING	3
2.2 RESULTATEN	6
2.3 DISCUSSIE	8
3 KRISTALLISATIE ONDERZOEK	10
3.1 KRISTALLISATIE EN VERWERKING	10
3.2 RESULTATEN	10
3.3 DISCUSSIE	10
4 SAMENVATTING	14
5 NAWOORD	15
6 LITERATUUR	16
TEST VERSCHIL 1E EN 2E PREPARAAT	17
TEST VERSCHILLEN PER PREPARAAT	18
FIGUREN	19

INLEIDING

1 INLEIDING

De populatie van de gewone zeehond, *Phoca vitulina*, in het nederlandse deel van de Waddenzee is sinds de tweede wereldoorlog drastisch in omvang afgenomen (REIJNDERS, 1976). Dit werd in eerste instantie veroorzaakt door een zeer intensieve jacht op zeehondenpups. Die jacht is in 1963 verboden. De populatie nam na dit verbod weer toe, maar begon na 1965 weer af te nemen. Oorzaak van deze afname was een sterke daling van het aantal pups dat er jaarlijks geboren werd. In vergelijking met zeehondenpopulaties in andere delen van de Waddenzee (Niedersachsen, Schleswich-Holstein) is het aandeel van de pups in de totale populatie erg laag, namelijk ongeveer de helft van het aandeel in de andere sub-populaties. Onderzoek naar verschillen in leefomstandigheden van de diverse sub-populaties bracht geen duidelijkheid met betrekking tot de mogelijke oorzaken. Vergelijking van concentraties van verontreinigingen in dood aangetroffen zeehonden bracht wel een duidelijk verschil aan het licht. De zeehonden uit het nederlandse deel bevatten een 10 x zo hoge concentratie aan PCB's (poly-chloor-bi-phenylen) als dieren uit de andere delen. De gehalten aan andere gechloreerde koolwaterstoffen en aan zware metalen vertoonden geen significante verschillen (REIJNDERS, 1980).

Bekend is dat PCB's de vruchtbaarheid van nertsen (*Mustela vison*) sterk doet afnemen (AULERICH & RINGER, 1977; JENSEN et al, 1977). Ook bij ringelrobber (*Phoca hispida*) in de Botnische Golf is dit waargenomen (HELLE et al, 1976). De daarbij gevonden pathologische afwijkingen aan de baarmoeder zijn echter bij de nederlandse zeehonden nooit aangetroffen. Aan de hand van deze gegevens kwam P.Reijnders tot de hypothese dat de PCB's verantwoordelijk kunnen zijn voor de teruggang van het zeehondenbestand in het nederlandse deel van de Waddenzee.

Om die te toetsen is in 1981 een proef gestart op het R.I.N. (Rijksinstituut voor Natuurbeheer) op Texel, onder leiding van P. Reijnders. Hier leven 2 groepen gewone zeehonden in gevangenschap. Een groep wordt gevoerd met platvis uit de Waddenzee, welke een hoog gehalte aan PCB's bevat. De andere groep krijgt makreel uit de Noordzee, met een veel lager gehalte aan PCB's. Van beide groepen wordt nu de reproductie-cyclus gevolgd en er wordt bekeken of er verschillen ontstaan tussen die groepen. De meest voor de hand liggende methode om die cyclus te volgen is het bepalen van de gehalten aan geslachtshormonen in het bloed. Hiertoe wordt regelmatig bloed afgenomen. De tijd tussen 2 monsternames varieert van 5 dagen in de periode dat de oestrus verwacht wordt, tot een maand in de overige tijd van het jaar.

Van een aantal diersoorten is het bekend, dat de reproductie-cyclus ook gevolgd kan worden aan de hand van veranderingen in het epitheel van de vaginawand. Deze veranderingen kunnen gevolgd worden door te kijken naar het voorkomen van bepaalde typen cellen in uitstrijkjes van de vagina vloeistof. Dit is onder andere gedaan voor de rat (HARTMAN, 1944; SHORT, 1972) en de hond (SCHUTTE, 1967a, b, c). Ook kan gekeken worden naar veranderingen in het patroon van kristallisaties, als de vagina vloeistof aan lucht wordt gedroogd. Dit is onder andere gedaan voor het varken (BETTERIDGE & RAESIDE, 1961).

INLEIDING

Bij beschouwing van de hormoonspiegels wordt in het algemeen het volgende beeld verkregen. Voor de oestrus neemt het oestradiol gehalte in het bloed aanvankelijk sterk toe en neemt dan weer af. Na de oestrus neemt het progesteron gehalte toe. Is het dier bevrucht, dan zal dit een tijd lang blijven stijgen. Is het dier niet zwanger, dan zal het progesteron gehalte weer terug zakken naar het basale niveau. Tijdens de oestrus zijn de gehalten van zowel het oestradiol als het progesteron laag.

Dit verslag behandelt alleen het onderzoek aan de vagina uitstrijkjes (zowel de histologie als de kristalpatronen). Het is een vervolg op het verslag over het zelfde onderwerp door Anneke ter Borg (1982). Voor meer details over de methode en voor verdere achtergronden wordt u naar dit verslag verwezen. De populatie-dynamica van de Waddenzee populatie van de gewone zeehond wordt hier niet besproken, daar hieraan een apart verslag gewijd wordt.

HISTOLOGISCH ONDERZOEK

De telmethode is dezelfde als degene die Anneke ter Borg gebruikt heeft: tellen totdat een totaal van ongeveer 100 cellen bereikt is. Overheersen de leucocyten sterk, dan wordt, als de 100 bereikt is, doorgeteld met de overige 2 celtypen, om tot een betrouwbaarder verhouding te komen tussen die 2.

Bij de analyse van de resultaten is gebruik gemaakt van 2 verhoudingsgetallen. De reden dat die getallen geïntroduceerd zijn, is dat het begrip dominantie (het overheersen van 1 bepaald celtype), dat Anneke ter Borg hanteert, hier niet toegepast mag worden. De belangrijkste reden hiervoor is, dat er dan een bepaalde verdeling van de cellen wordt verondersteld, die inhoudt dat in principe alle typen zouden kunnen overheersen. Over de verdeling is echter niets bekend en dus mag het begrip dominantie hier niet gebruikt worden. Er kunnen best significante fluctuaties optreden in de frequentie waarin een bepaald type voorkomt, zonder dat het dominante celtype verandert. Bovendien wordt bij dominantie gekeken naar het totale beeld. Dit heeft het nadeel, dat het beeld verstoort kan worden als er fluctuaties in een bepaald celtype optreden, die niet samenhangen met de reproductie-cyclus. Met name de leucocyten kunnen dan storend optreden. Massaal voorkomen van deze cellen kan namelijk meerdere oorzaken hebben. Het kan samenhangen met de hormoonspiegels in het bloed (dat is de reden dat er naar gekeken wordt), maar het kan ook veroorzaakt worden door bijv. een ontsteking in de vagina. Als dit laatste het geval is dan wordt het beeld ernstig verstoord als er naar dominantie gekeken wordt. Daarom zijn de volgende verhoudingsgetallen gebruikt:

- LI (Leucocyten Index): dit is het aantal leucocyten, gedeeld door het totaal aantal getelde cellen.
- NI (Nucleus Index): dit is het aantal cellen met kern, gedeeld door het totaal aantal epitheelcellen (cellen met kern en verhoorde cellen).

Het tweede getal is vrij van storingen als gevolg van fluctuaties in het aantal leucocyten. Deze verhoudingsgetallen zijn andere indices als die SCHUTTE (1967c) gebruikt heeft, omdat voor die indices een gedetailleerder indeling van epitheelcellen nodig is dan welke hier toegepast is.

De dieren zijn bij de analyse onderverdeeld in een zevental groepen, op basis van leeftijd en voedsel (platvis en makreel). Deze indeling was als volgt:

- 1) dieren die in de bestudeerde periode zwanger waren: 143 en 307
- 2) leeftijd 5 jaar en ouder, makreelgroep: 147, 308, 323 en 324
- 3) leeftijd 5 jaar en ouder, platvisgroep: 153, 327 en 328
- 4) leeftijd 4 jaar, makreelgroep: 309, 326 en 332
- 5) leeftijd 4 jaar, platvisgroep: 310, 325, 329 en 331
- 6) leeftijd 3 jaar, makreelgroep: 302, 322, 330 en 1677

7) leeftijd 3 jaar, platvisgroep: 304, 306, 311, 321 en 334

2.2 RESULTATEN

Allereerst is gekeken hoe betrouwbaar de methode was. Dit is op 2 manieren gedaan. Bij een monsterring worden altijd 2 preparaten gemaakt: de eerste is bedoeld voor de kristallisaties (die in het volgende hoofdstuk worden besproken) en de tweede voor het histologische deel. Voor de controle is, na het bekijken op kristallen, het eerste preparaat van een serie ook gekleurd en de cellen geteld. Dit om te bekijken of er verschil is tussen eerste en tweede preparaat. De resultaten hiervan staan in appendix 1. Op deze gegevens is een tekentoets toegepast om te zien of er misschien een systematisch verschil tussen beide zou zijn. De gevonden waarden verschilden soms enorm, maar een systematische afwijking kon niet aangetoond worden (voor de tekentoets zie bijv. WIJVENKATE, 1976). Van een andere serie zijn een aantal preparaten twee keer geteld, een keer op de gebruikelijke manier (rechts-boven beginnen, als het nummer van het glaasje aan de rechterkant ligt) en een keer van de andere kant af (dus vanaf links-onder). Ook hierin kon geen systematische afwijking worden ontdekt.

Het eerste dat opvalt aan de resultaten is de enorme spreiding. De spreiding kan 3 oorzaken hebben. Ten eerste is het mogelijk dat de jongste dieren nog niet geslachtsrijp zijn. De veranderingen in het vagina-epitheel zullen dan afwijken van die bij de oudere, wel geslachtsrijpe dieren. Ten tweede is het mogelijk dat de cycli van de verschillende dieren niet synchroon lopen, zodat ze niet tegelijk in oestrus conditie komen. Een derde mogelijkheid is dat de verdeling van de celtypen niet afhangt van het moment in de reproductie-cyclus. Dit zou dan betekenen dat het niet mogelijk is deze cyclus bij de zeehond te volgen aan de hand van vaginaal uitstrijkjes. Er zijn verschillende pogingen gedaan om deze ruis te verkleinen. De resultaten zijn bekeken per leeftijds categorie. In fig. 6a en b kun je zien dat het verschil tussen de klassen 3-jarigen en de klasse 5 jaar en ouder miniem zijn. Als je dat vergelijkt met fig 6c, waarin alle leeftijdsklasse zijn samengevoegd, dan zie je dat ook de spreiding daar niet kleiner door geworden is. Er is ook een poging gedaan om de resultaten te groeperen met betrekking tot het tijdstip waarop de oestrus begint. Hiertoe zijn de gegevens van dieren die op dezelfde monsterdatum een piek in het niveau van oestradiol vertoonden zijn samengevoegd, gebruik makend van gegevens over de hormoonspiegels die P. Reijnders verzameld heeft. Het resultaat kun je zien in fig 6d voor de dieren die een piek vertonen rond 16 juni; dit zijn in totaal 8 dieren. Ook dit levert geen essentieel ander beeld op. Splitsing van de resultaten op grond van het voedselaanbod levert de plaatjes op van fig 7. Fig 7a geeft het beeld voor de makreelgroep en fig 7b dat voor de platvisgroep. Ook hier zijn er geen duidelijke verschillen. Omdat opslitsing geen verduidelijking geeft zijn verder alle gegevens samengevoegd, behalve die van de dieren die zwanger zijn geweest.

Het algemene beeld wat nu naar voren komt is het volgende. In de loop van de beschouwde periode doen zich geen duidelijke veranderingen voor in de celinhoud van de vaginale vloeistof. De frequenties van bepaalde celtypen kan tussen de dieren onderling sterk verschillen. Alleen in de maand juli, als de oestrus wordt verwacht op grond van gedragsobservaties, zijn de onderlinge verschillen erg klein, wat tot uiting komt in een zeer kleine spreiding, met name in de NI. Ook de spreiding in de LI wordt wat geringer, maar in veel mindere mate. De

LI is dan laag, wat inhoudt dat er relatief weinig leucocyten aanwezig zijn. De NI is juist erg hoog, boven de 90%, wat wil zeggen dat bij de epitheelcellen de cellen met kern duidelijk overheersen. Opvallend is daarnaast, dat in deze periode de dichtheid van de cellen in het preparaat vaak erg hoog is. In de preparaten uit juli zitten in het algemeen veel meer cellen dan in preparaten uit andere maanden, dus uit andere perioden uit de cyclus. Als de dichtheden hoog zijn, zijn vaak groepjes samenhangende cellen te vinden (zie fig 2).

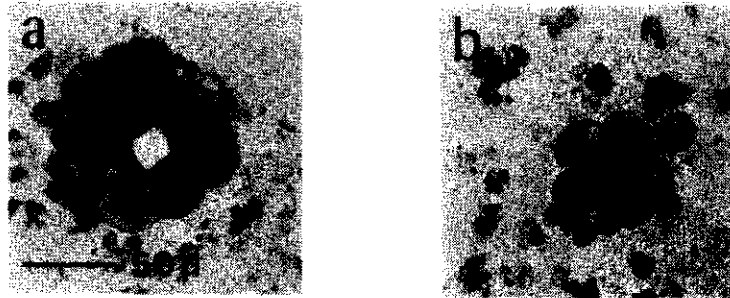


Fig. 2. Groepjes intermediaire epitheelcellen. In beide zijn enkele cellen met grote vacuolen ("foamy cells") te zien

In de periode juni-juli werden twee typen afwijkende cellen aangetroffen. SCHUTTE (1967b) noemt deze cellen ook en zegt dat ze behoren bij de met-oestrus fase in de hond.

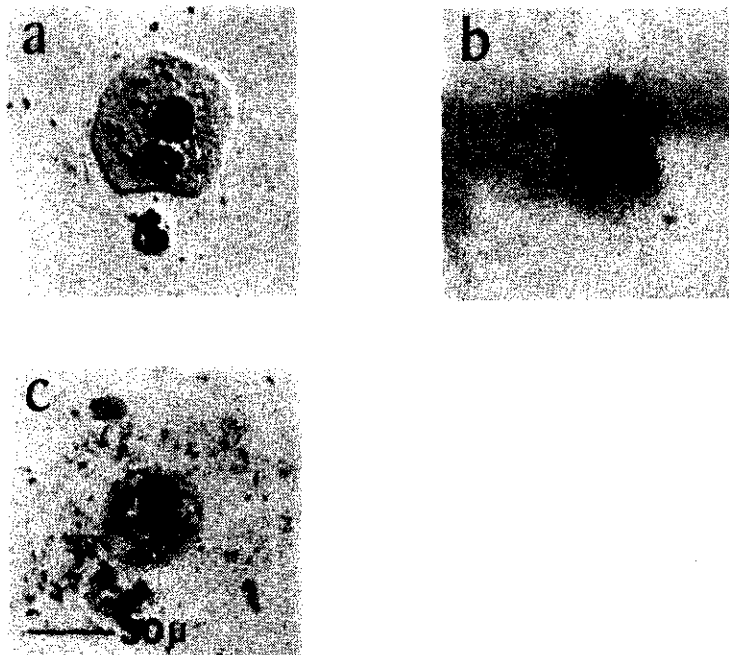


Fig. 3. Bijzondere celtypen: a+b= "met-oestrus" cellen: dit zijn epitheelcellen waarin zich een leucocyt bevindt -c- "foamy" cel: cel met grote vacuolen.

Het gaat hierbij om de volgende typen:

- de met-oestrus cel: dit is een parabasaal of een intermediaire cel, waarin zich leucocyten bevinden (zie fig 3a,b). Het grootste aantal leucocyten per cel bij de zeehond bedraagt 2.
- de "foamy cell": dit is een intermediaire cel met grote vacuolen (zie fig 3c). Hierdoor krijgt de cel soms een wat schuimachtig uiterlijk.

De zwangere dieren zijn in het voorgaande niet betrokken. Over de celpatronen bij deze dieren kunnen twee dingen gezegd worden. Uit fig. 8 blijkt dat naarmate de geboorte, aangegeven in fig. 8 door een verticale lijn, nadert, de LI toeneemt. (De grafiek van dier nr. 307 is onderbroken, omdat er een monsterring ontbreekt, namelijk de eerste datum na de geboorte van de pups.) Er komen dus steeds meer leucocyten in de vagina terecht. De absolute waarde van de LI is echter voor beide dieren sterk verschillend. Ook het verloop na de geboorte van de pups is sterk verschillend. Overeenkomstig hetgeen bij de andere dieren gevonden is, vertonen ook deze dieren de hoge waarde van de NI in juli.

2.3 DISCUSSIE

Het beeld, dat verkregen wordt uit de uitstrijkjes is weinig eenduidig, behalve dat van juli. Dan worden er weinig leucocyten en weinig verhoorde cellen gevonden en veel cellen met kern. Dit komt overeen met wat BIGG (1973) gevonden heeft. Als dit resultaat wordt vergeleken met dat van Anneke ter Borg (1982), dan vallen 2 dingen op. Ten eerste zijn de percentages verhoorde cellen die zij vindt hoger dan in dit onderzoek. Dit kan 2 oorzaken hebben: verschillen in het nemen van de monsters of verschillen in de interpretatie ervan (bij voorbeeld het al of niet mee tellen van fragmenten van verhoorde cellen). Ten tweede wijkt haar conclusie over het beeld tijdens de oestrus af van de hier getrokken conclusie. Bij vergelijking van fig. 10 uit haar verslag met fig. 6c van dit verslag blijkt echter dat de resultaten niet wezenlijk verschillen. Het verschil vloeit voort uit haar definitie van de oestrus. Zij definieert die als de periode waarin een hoog gehalte aan verhoorde cellen optreedt. Deze definitie is afgeleid van het beeld dat verkregen wordt bij de rat en dat mag niet zonder meer als ook geldend voor de zeehond beschouwd worden. Er moet juist een onafhankelijke variabele zijn, aan de hand waarvan het tijdstip van oestrus bepaald wordt, zoals het optreden van baltsgedrag. Wordt zo'n variabele gebruikt, dan blijkt dat het beeld weliswaar afwijkt van dat van de rat, maar dat het in overeenstemming is met de resultaten van BIGG (1973).

Er kleven enkele bezwaren aan de gebruikte methode van uitstrijkjes nemen. Ook al neem je het monster op de juiste plaats, dan nog is contact met het voorste deel van de vagina en de vagina-mond bij het inbrengen en weer terug halen van het wattenstaafje onvermijdelijk. Dit zou wel eens van invloed kunnen zijn op het beeld. Een tweede bezwaar geldt de reactie van sommige dieren op het maken van de uitstrijkjes. Hiermee bedoel ik nu niet de stress die dit voor de dieren met zich mee brengt, hoewel dat natuurlijk ook een bezwaar is. Wat ik bedoel is het volgende. Per monsterring worden twee uitstrijkjes

HISTOLOGISCH ONDERZOEK

genomen. Vaak kan echter het tweede uitstrijkje niet op dezelfde plaats genomen worden als het eerste. Dit komt doordat sommige dieren bij het tweede uitstrijkje de vagina afsluiten (door spiercontractie), of zich juist na het eerste ontspannen, waardoor je het tweede monster minder diep, resp. dieper neemt dan het eerste. Dit bezwaar kan ondervangen worden door een speculum te gebruiken. Hieraan kleven echter ook enkele bezwaren. Ten eerste zou het inbrengen hiervan extra stress bij de dieren teweeg brengen. Het tweede bezwaar heeft te maken met het feit dat de dieren vaak urineren tijdens de monsterring. Als je snel genoeg bent kan je het eerste monster nemen voordat het dier urineert. Breng je eerst een speculum aan dan is dat vrijwel uitgesloten. Dat betekent dat ook je eerste monster verontreinigt raakt met urine en dat zal het beeld bij de kristallisaties ernstig kunnen verstoren.

Met betrekking tot de afwijkende cellen, de "met-oestrus" cellen en de "foamy" cellen, is vooral het tijdvak waarin ze gevonden worden opmerkelijk. SCHUTTE (1967b) vermeldt dat deze cellen vooral optreden in de met-oestrus fase, dus de fase na de oestrus. De periode waarin ze bij zeehonden worden aangetroffen, juni en juli, komt waarschijnlijk overeen met de pro-oestrus fase. Aangezien SCHUTTE geen verklaring geeft voor deze cellen en het alleen laat bij de constatering dat ze er zijn, is het moeilijk om een reden aan te geven voor dit verschil.

Over de zwangere dieren valt weinig te zeggen, omdat hun aantal te klein is. Er lijkt een tendens te zijn in de LI om toe te nemen, naarmate de zwangerschap vordert, maar of dit echt zo is zal later moeten blijken, als meer gegevens over meer dieren beschikbaar zijn. Beide dieren vertonen wel de piek in de NI in juli, die op de oestrus duidt. De beide pups zijn begin juli geboren. De lactatieperiode duurt ongeveer 4 weken, dus die zou eind juli moeten eindigen. Direct daarna zou de oestrus op kunnen treden en dat is, getuige de NI piek, ook waarschijnlijk wat er gebeurt.

Samenvattend kunnen we stellen, dat met deze techniek, vooropgesteld dat we een aantal dieren hebben, kunnen zeggen wanneer de oestrus plaats heeft gehad, aan de hand van de hoge waarde van de NI en de kleine spreiding ervan. Voor het volgen van de volledige cyclus in 1 dier is deze techniek niet betrouwbaar.

3 KRISTALLISATIE ONDERZOEK

3.1 KRISTALLISATIE EN VERWERKING

Het verschijnsel van kristallisaties in vagina uitstrijkjes is voor het eerst beschreven bij de mens, door PAPANICOLAOU (1946). Nadien is hetzelfde fenomeen onderzocht bij diverse diersoorten, waaronder koeien, schapen, honden, konijnen, apen en varkens (voor een overzicht zie BETTERIDGE, 1961). In het algemeen is de mate van kristallisatie het hoogst bij het begin van de oestrus (BETTERIDGE & RAESIDE, 1962).

De methode van het nemen van de monsters is dezelfde als die beschreven in hoofdstuk 2. Het classificatie schema, dat ze hanteert (afgeleid van dat van BETTERIDGE & RAESIDE, 1962) en waarin ze 6 stadia onderscheidt is echter niet aangehouden. Doordat deze stadia dicht bij elkaar liggen is het vaak moeilijk een bepaald patroon eenduidig te classificeren. Daarom is gekozen voor een simpeler indeling. Duidelijke kristalvorming wordt beoordeeld als positief. Hieronder vallen de klassen 2, 2/3 en 3. De rest, dus de klassen 0, 1 en 1/2, worden beoordeeld als negatief. De kristallisaties zijn steeds bekeken op de dag dat de monsters genomen zijn, behalve de monsters van augustus. Die zijn een dag later bekeken, omdat op die datum alle dieren op een dag bemonsterd zijn, terwijl dit normaal over twee dagen verspreid wordt.

3.2 RESULTATEN

In fig. 4a-c zijn een aantal voorbeelden te zien van de gevonden kristallen. Fig. 4d laat het patroon zien wat ontstaat als een preparaat verontreinigd wordt met zeewater. Kristallisaties komen het meest voor zo rond de oestrus, in juli (zie fig. 5). In juni vertoont 52% van de preparaten kristallisaties. Op de drie monsterdata in juli is dat het geval voor resp. 40, 40 en 72% van de preparaten. Als deze drie data samengevoegd worden, dan zijn in de preparaten van 88% (22 van de 25) van de dieren kristallen gevonden. Ook de twee zwangere dieren vertonen kristallisaties in juni en juli. In augustus zijn geen kristallen gevonden, in september daarentegen weer wel, in 28%. Er zijn ook monsters bekeken op kristallen in november en december. In deze monsters werden geen kristallen aangetroffen.

3.3 DISCUSSIE

De meeste kristallisaties worden gezien voor en in de oestrus, de periode juni en juli. In augustus zijn geen kristallen gevonden, maar dat kan samenhangen met het feit, dat deze preparaten een dag later zijn bekeken dan normaal. De dichtheid en de structuur van de kristallen kunnen na een dag namelijk aanmerkelijk veranderen (Anneke ter Borg, 1982). Opvallend is dat alle gevonden kristallen vallen onder het type dat Anneke ter Borg afwijkend noemt. De kristallen, zoals zij die beschrijft, zijn in het geheel niet gevonden in de bestudeerde periode (voor de kristallisaties is dat van april tot en met december). Wat de oorzaak is van dit verschil is niet duidelijk. Mogelijk dat er verschillen zijn geweest in het nemen van de monsters

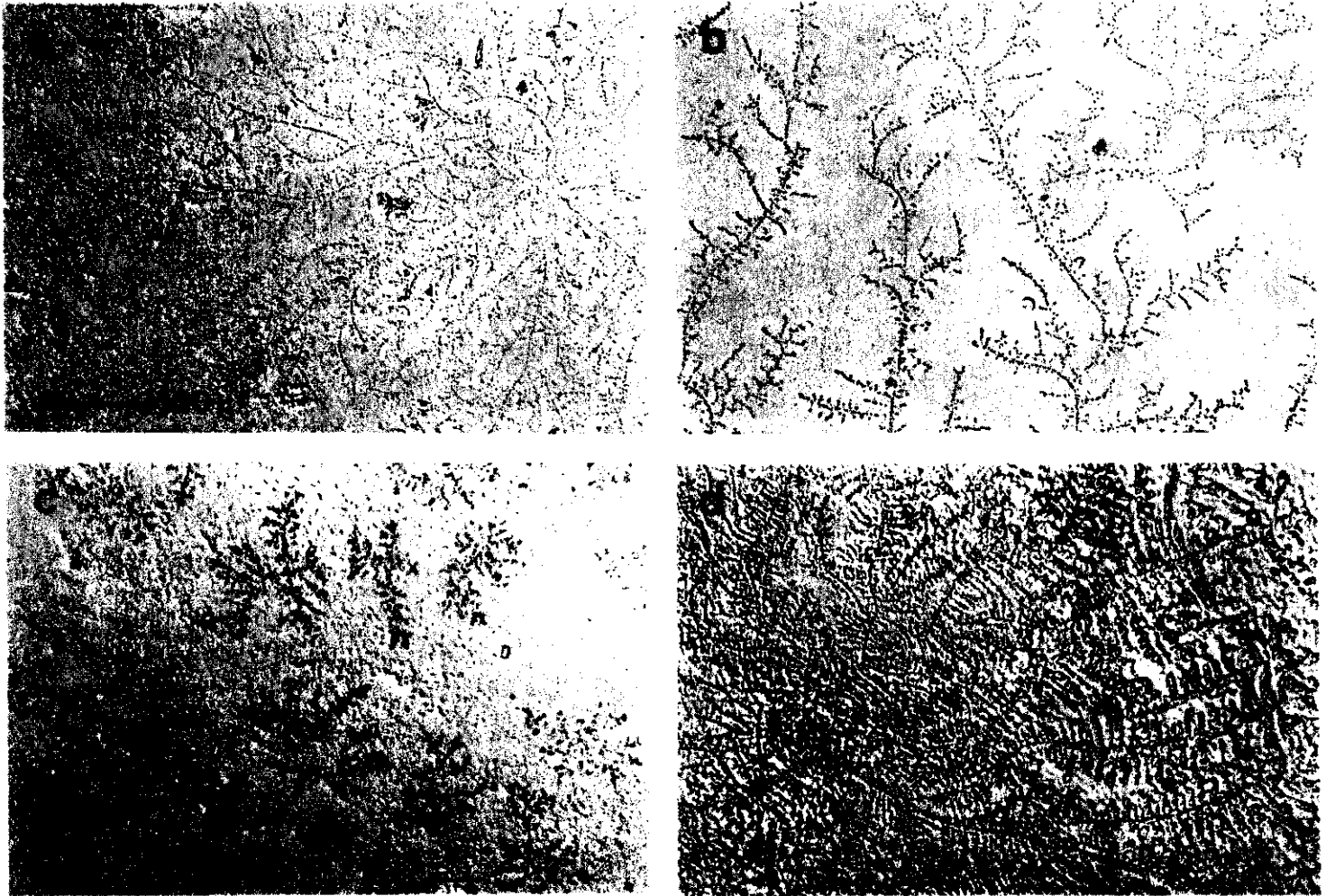


Fig. 4. Voorbeelden van kristallisaties. a t/m c: normale kristallen
d: kristallisatie van zeewater.

en het behandelen hiervan. Er zijn aanwijzingen, dat dat het geval zou kunnen zijn. Anneke ondervond moeilijkheden bij het fotograferen van kristallen: tijdens het belichten verdwenen deze.

De kristallisaties worden gezien als een indicator voor de aanvang van de oestrus (BETTERIDGE & RAESIDE, 1962). Uit dit onderzoek blijkt, dat ze bij de zeehond het meest voorkomen tijdens de oestrus. Dit is in tegenspraak met de resultaten van Anneke ter Borg: zij vond dat het percentage preparaten waarin duidelijke kristallen te zien waren (klassen 2 t/m 3) vrijwel constant bleef over de periode juli tot en met oktober, namelijk rond de 20%. Het huidige onderzoek laat een duidelijke piek zien in de maanden juni en juli. Dit betekent echter niet dat de kristallisaties kunnen dienen als een indicator voor de oestrus. Ook voor de oestrus komen ze veel voor en bovendien komen ze ook voor bij de dieren 143 en 307 op het moment dat ze beiden nog zwanger waren. Van een voorbereiding van het lichaam op de oestrus kan dan nog geen sprake zijn. Er zijn dus waarschijnlijk meer factoren die van invloed zijn op het optreden van kristallisaties.

KRISTALLISATIE ONDERZOEK

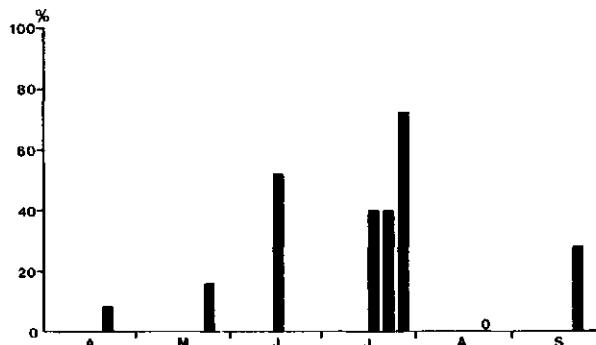


Fig. 5. Resultaten van het kristallisatie-onderzoek. De hoogte van de staafdiagrammen geeft aan in hoeveel procent van de preparaten kristallen zijn aangetroffen.

Er waren 3 dieren die in juli in het geheel geen kristallisaties vertoonden. Dat waren 325 en 332 (beiden 4 jaar oud) en 334 (3 jaar oud). Bij 325 zijn in het geheel geen kristallen gevonden, bij de overige twee wel, onder andere in juni. Mogelijk zijn deze dieren nog niet geslachtsrijp geweest.

De interpretatie van de preparaten is bij de gehanteerde indeling niet moeilijk. Het is een kwestie van kijken of er duidelijke kristallen zijn of niet. Vergelijking van fig. 4a-c met 4d doet vermoeden dat er weinig twijfel kan bestaan over de vraag of het een kristal uit de vaginavloeistof betreft of een kristal, ontstaan door zeewater. Zo eenvoudig ligt de zaak helaas niet. Er zijn talloze mengvormen gezien, waarbij een kristal, zoals uit fig. 4a of 4b geleidelijk overging in een zoutkristal. Soms worden ook kristallen aangetroffen die in hun geheel het uiterlijk hebben van zo'n overgang. Deze laatste categorie is steeds beschouwd als zijnde zoutkristallen. Alleen als duidelijk structuren te onderscheiden waren zoals die in fig. 4a-c zijn ze als kristallisatie aangemerkt. Het komt ook wel voor dat een preparaat dusdanig met zeewater verontreinigd is, dat door de zoutkristallen niet meer te zien is of er nog andere zijn, hoewel die normaal gesproken er wel zouden zijn. Doordat in de zomermaanden buiten, in de bassins, gemonsterd wordt is de kans dat een preparaat verontreinigd wordt met zeewater erg groot. Als er zorgvuldig gewerkt wordt, kan de schade meestal beperkt blijven tot enkele spatjes, die niet het hele preparaat bederven. Een bijkomend probleem vormt het urineren van de dieren tijdens het nemen van de uitstrijkjes. Bij snel handelen lukt het vaak het eerste monster te nemen voordat het dier urineert. Lukt dat niet, dan is de kans groot dat het preparaat verontreinigd wordt met zoutkristallen uit de urine. Verder is het ook hier belangrijk dat het monster genomen wordt zo dicht mogelijk bij de baarmoedermond. Problemen die zich in dit opzicht kunnen voordoen zijn al in het vorige hoofdstuk aan de orde gekomen.

KRISTALLISATIE ONDERZOEK

De eindconclusie is dat de kristalpatronen niet bruikbaar zijn als indicator voor de oestrus. Ten eerste is het optreden van kristallisaties geen garantie dat je in de oestrus fase bent, want ook daarvoor en erna worden ze gevonden, terwijl ze ook bij de zwangere dieren optraden. Ten tweede is de kans op verontreiniging met urine of zeewater dermate groot, dat verstoringen van het patroon regelmatig optreden.

4 SAMENVATTING

In dit onderzoek is getracht de oestrus-cyclus van de gewone zeehond, *Phoca vitulina*, te volgen aan de hand van vagina uitstrijkjes. Hierbij werd gekeken naar het voorkomen van bepaalde celtypen en naar het optreden van kristallisaties. Het beeld dat het histologische deel opleverde is vaag. Alleen in juli, in de oestrus fase, is het beeld duidelijk: er zijn dan veel epitheelcellen met kern, weinig verhoorde cellen en weinig leucocyten. Kristallisaties traden vooral op in de oestrus fase. Ze komen echter ook in andere delen van de cyclus voor en kunnen daarom geen dienst doen als indicator voor de oestrus. Daarnaast is de methode ook nog erg kwetsbaar. De conclusie hieruit is dat het niet mogelijk is de oestrus-cyclus van een zeehond te volgen aan de hand van vagina uitstrijkjes. Bij beschouwing van meerdere dieren kan het tijdstip van de oestrus bepaald worden door bij het histologisch onderzoek te letten op het verminderen van de spreiding.

NAWOORD

5 NAWOORD

Dit nawoord wil ik gebruiken om enige mensen te bedanken. Allereerst Peter Reijnders voor zijn begeleiding en voor de gesprekken over het werk en andere onderwerpen. Ook Ab Dral ben ik veel dank verschuldigd voor zijn vaak nuttige adviezen en de vele boeiende gesprekken over de meest uiteenlopende onderwerpen. Ik ben er wijzer van geworden. Verder bedank ik Michel Binsbergen voor zijn hulp bij het maken van de figuren en ik bedank alle RIN medewerkers voor de vaak prettige sfeer waarin ik heb kunnen werken.

6 LITERATUUR

- AULERICH, R.J.; RINGER, R.K. (1977): Current status of PCB toxicity to mink, and effect on their reproduction. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 6: 279-292
- BETTERIDGE, K.J. (1961): An investigation of some methods of assessing ovarian activity in swine. Thesis, Ontario Vet. Coll., Guelph, Canada.
- BETTERIDGE, K.J.; RAESIDE, J.I. (1962): Investigation of cervical mucus as an indicator of ovarian activity in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 3: 410-421
- BIGG, M.A. (1973): Adaptions in the breeding of the harbour seal, *Phoca vitulina*. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 19: 131-142
- BORG, A. ter (1982): De oestrus-cyclus van de gewone zeehond, *Phoca vitulina*, beschreven met behulp van vagina uitstrijkjes. Intern verslag RIN
- HARTMAN, C.G. (1944): Some new observations on the vaginal smears of the rat. *Yale J. Biol. and Med.* 17(1): 99-112
- HELLE, E.; OLSSON, M.; JENSEN, S. (1976): PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. *Ambio* 5: 261-263
- JENSEN, S.; KIHLESTROM, J.E.; OLSSON, M.; LUNDBERG, C.; ORBERG, J. (1977): Effects of PCB and DDT on mink (*Mustela vison*) during the reproductive season. *Ambio* 6(4): 239
- PAPANICOLAOU, G.N. (1946): Cyclic changes in the physical and chemical properties of cervical mucus. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 51: 316
- REIJNDERS, P.J.H. (1976): The harbour seal (*Phoca vitulina*) population in the Dutch Wadden Sea. *Neth. J. Sea Res.* 12(2): 164-179
- REIJNDERS, P.J.H. (1980): Organochlorine and heavy metal residues in the harbour seals from the Wadden Sea and their possible effect on reproduction. *Neth. J. Sea Res.* 14(1): 30-65
- SCHUTTE, A.P. (1967a): Canine vaginal cytology. I- Technique and cytological morphology. *J. Small Anim. Pract.* 8: 301-306
- SCHUTTE, A.P. (1967b): Canine vaginal cytology. II- Cyclic changes. *J. Small Anim. Pract.* 8: 307-311
- SCHUTTE, A.P. (1967c): Canine vaginal cytology. III- Compilation and evaluation of cellular indices. *J. Small Anim. Pract.* 8: 313-317
- SHORT, R.V. (1972): Role of hormones in sex cycles. In: AUSTIN, C.V.; SHORT, R.V. (eds.): *Hormones in reproduction*. Cambr. Univ. Press
- WIJVENKATE, M.L. (1976): *Verklarende statistiek* (15e druk) Het Spectrum, Utrecht/Antwerpen.

APPENDIX 1

TEST VERSCHIL 1E EN 2E PREPARAAT

In de volgende tabel zijn de gegevens opgenomen die behoren bij de test op een verschil tussen eerste en tweede preparaat.

1	2	3	4	5	6	7
143	70	67	-	97	73	-
147	77	21	-	86	52	-
153	14	100	+	73	66	-
302	42	36	-	67	68	+
304	9	9	0	8	48	+
306	35	67	+	92	88	-
307	38	72	+	85	64	-
308	87	88	+	90	83	-
309	49	61	+	85	67	-
310	1	4	+	29	43	+
311	42	24	-	28	24	-
321	3	20	+	6	33	+
322	41	6	-	58	61	+
323	9	41	+	88	78	-
324	16	28	+	93	79	-
325	0	21	+	34	54	+
326	38	18	-	55	63	+
327	76	100	+	90	73	-
328	61	88	+	80	78	-
329	26	71	+	86	73	-
330	73	29	-	85	75	-
331	25	38	+	81	81	0
332	64	81	+	89	95	+
334	22	27	+	91	89	-
1677	39	76	+	89	58	-
		T= +10			T= -8	
		N= 24			N= 24	
		p=0.10			p>0.10	

De betekenis van de kolommen is als volgt:

- 1) nummer van het dier
- 2) originele (=tweede) preparaat, LI waarde
- 3) test (=eerste, kristallisatie) preparaat, LI waarde
- 4) teken in tekentoets
- 5) originele (=tweede) preparaat, NI waarde
- 6) test (=eerste, kristallisatie) preparaat, NI waarde
- 7) teken in tekentoets

TEST VERSCHILLEN PER PREPARAAT

Dit zijn de gegevens die horen bij de test op de betrouwbaarheid van de tellingen per preparaat. Bij deze test zijn de preparaten twee maal bekeken: een maal op de normale manier, dus vanaf rechtsboven en een maal vanaf links onder. De betekenis van de kolommen is als volgt:

- 1) nummer van het dier
- 2) normale telling, LI waarde
- 3) test telling, LI waarde
- 4) teken in tekentoets
- 5) normale telling, NI waarde
- 6) test telling, NI waarde
- 7) teken in tekentoets

1	2	3	4	5	6	7
153	4	8	+	89	84	-
304	6	7	+	95	86	-
306	30	53	+	81	85	+
310	7	7	0	84	82	-
311	12	13	+	67	66	-
321	6	6	0	41	49	+
325	43	45	+	79	80	+
327	50	60	+	98	90	-
328	100	100	0	81	93	+
331	86	50	-	71	44	-
		T= +5			T= -2	
		N= 7			N= 10	
		p>0.10			p>0.10	

FIGUREN

De volgende figuren horen als bijlage bij dit verslag. Elk figuur bestaat uit 2 grafieken. De bovenste grafiek geeft steeds de LI weer en de onderste de NI.

Figuur 6:

- a) groepen 2 en 3, leeftijden 5 jaar en ouder
- b) groepen 6 en 7, leeftijd 3 jaar
- c) groepen 2 tot en met 7, alle dieren m.u.v. de zwangere dieren
- d) gesynchroniseerde groep: dieren die een oestradiol piek vertonen rond 16 juni

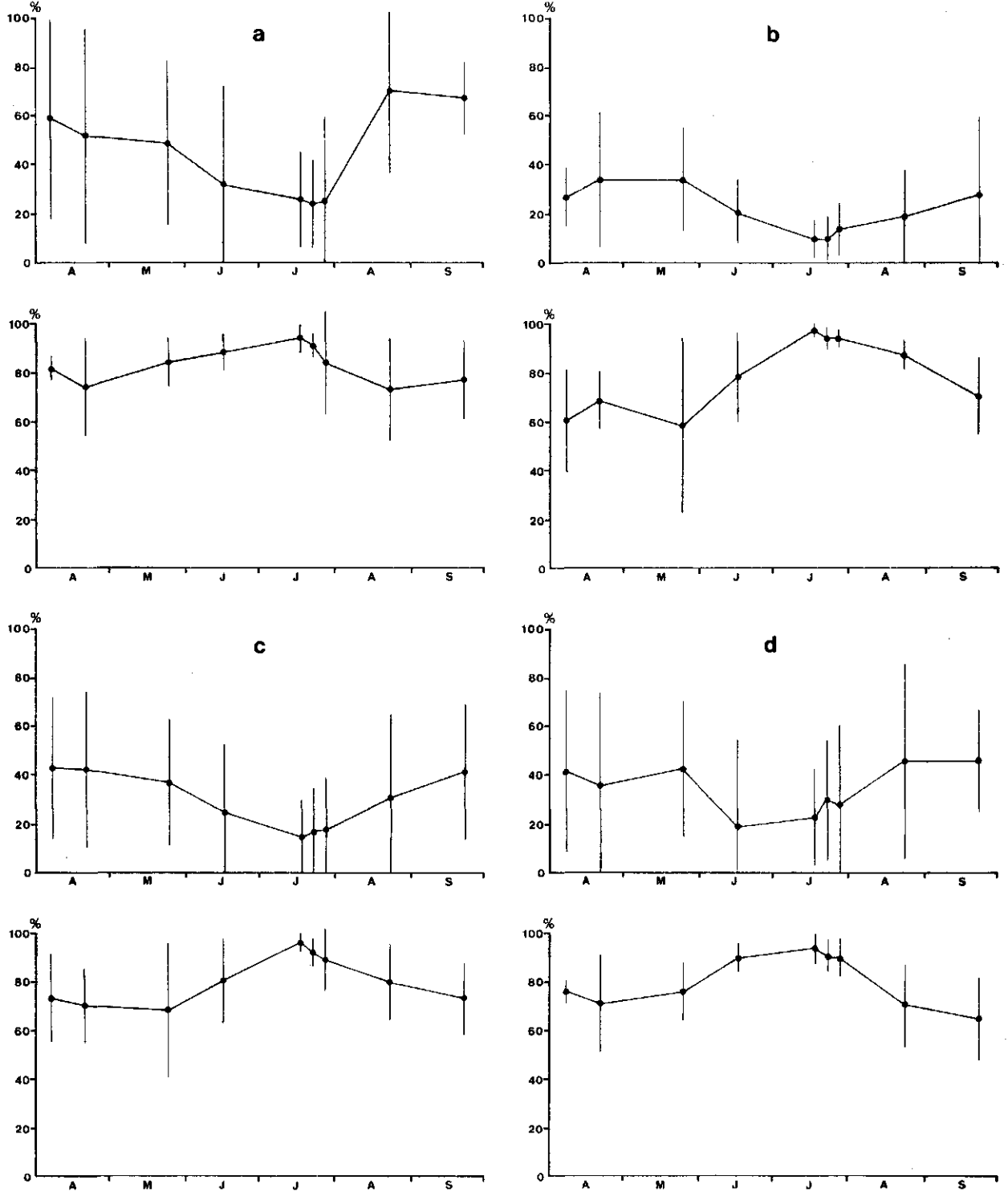
Figuur 7:

- a) volledige makreelgroep
- b) volledige platvisgroep

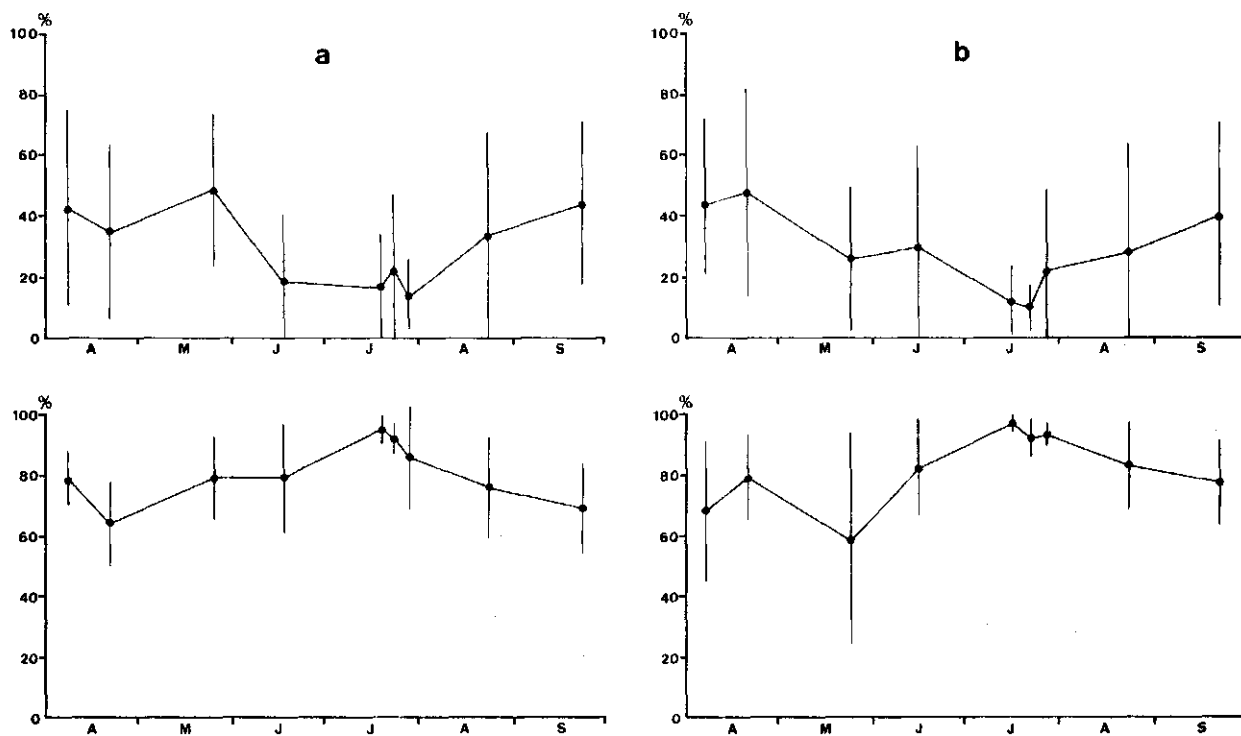
Figuur 8: zwangere dieren

- a) 143
- b) 307

Figur 6



Figur 7



Figur 8

