



Gonadale geslachtshormonen in de urine van een intersex (varken)

<https://hdl.handle.net/1874/321441>

Aguc 192, 1935

**GONADALE GESLACHTSHORMONEN
IN DE URINE VAN EEN
INTERSEX (VARKEN)**

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

J. DE REGT

GONADALE GESLACHTSHORMONEN
IN DE URINE VAN EEN
INTERSEX (VARKEN)

PROEFSCHRIFT

GONADALE GESLACHTSHORMONEN
IN DE URINE VAN EEN INTERSEX (Varken)

DE RECTOR

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

Diss. Utrecht 1935

GONADALE GESLACHTSHORMONEN IN DE URINE VAN EEN INTERSEX (VARKEN)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
DR. C. W. VOLLGRAFF, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEER-
TE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT
DER UNIVERSITEIT, TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER VEE-ARTSENIJKUN-
DE TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 20 DECEM-
BER 1935, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR
DOOR

— **JAN DE REGT** —

※

GEBOREN TE ROTTERDAM

※



DRUKKERIJ MERCHIEERS, GENT (BELGIE)

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

BOONDALE GESLACHTSROMMELN
IN DE URINE VAN EEN
INTERSEX (VARKEN)

PROEFSCHRIFT

TER VERBODING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE VEREENDE KUNSTEN
AAN DE RIJSDIVERSITEIT TE BATAVIA
OP DRAC VAN DEN RECHTERBANK
DR. E. W. VOLL GEAR HOOGLEERAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN EN WETENSCAPEN
TE VOOR DEN BEHALT VAN DEN GRAAD
DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDEGENING
VAN DE FACULTEIT DER VEREENDE KUNSTEN
DE TE VERBODING OF VRIJGANG TE BATAVIA
BER 1901 DES NAMDAGS TE 1 UUR
DOOR

JAN DE KEST

GEBORE TE ROTTERDAM



Aan de nagedachtenis mijner Ouders.
Aan mijn Vrouw.



Bij het verschijnen van dit proefschrift maak ik gaarne van de gelegenheid gebruik, mijn leermeesters in de diergeneeskundige studie mijn dank te betuigen voor het van hen genoten onderwijs.

Dank zij uw medewerking, Hooggeleerde RINGER, is het mogelijk geweest mijn onderzoek uit te voeren. Voor uw belangstelling en voor de ruime gelegenheid, die U mij gegeven hebt, op uw laboratorium mijn hormoonpreparaten te bereiden, blijf ik U ten zeerste dankbaar.

Naar U, Hooggeleerden KREDIET, hooggeachten promotor, gaan mijn bijzondere dank en erkentelijkheid uit voor de leerrijke en aangename jaren, die ik in uw instituut als assistent mocht doorbrengen. Dit proefschrift, als wetenschappelijk resultaat dezer jaren, is door mijn vertrek naar Gent meer dan een jaar later verschenen dan ik gewild had, daar mijn nieuwe werkkring het eerste jaar al mijn beschikbaren tijd opeischte. Het is mij een groote voldoening, dat ik nu dit werk heb kunnen beëindigen.

Hooggeleerde SJOLLEMA, U dank ik ten zeerste voor uw zeer gewaardeerde medewerking.

Hooggeachte SCHULZE, ik blijf het betreuren, dat ik door tijdgebrek niet méér van U kon leeren.

Waarde MEYLING, uw kennis en hulpvaardigheid zijn mij tijdens mijn assistentschap van groote beteekenis geweest.

Ook U, mevrouw BUITENHUIS, en U, VAN DER ZWEEP, die mij bij mijn onderzoek van dienst zijt geweest, zeg ik hartelijk dank.

Tot den Heer HERBER richt ik een woord van dank voor zijn uitstekende technische hulp, die hij mij verleend heeft.

By the receipt of the proceeds of the sale of the
property of the late ... in the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...

... of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...

... of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...

... of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...
of the ... of the ...

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

Bij onze huisdieren, en daarbij denk ik, voor zoover de zoogdieren betreft, zoo niet uitsluitend, dan toch hoofdzakelijk aan het varken en de geit, komt een afwijking voor, die gewoonlijk met den naam « hermaphrodisie » wordt aangeduid.

Men gebruikte, en gebruikt nog, dit woord voor die gevallen, waar men bij een dier goed ontwikkelde deelen van het mannelijk en van het vrouwelijk geslachtsapparaat waarneemt.

Aan het veterinair-anatomisch instituut van de Utrechtsche Universiteit, waar prof. Krediet zich reeds jarenlang met het verschijnsel der hermaphrodisie bij de huisdieren bezighoudt, krijgt men, na kennismaking met het groote aantal preparaten, die daar in den loop der jaren bijeengebracht zijn, den indruk, dat het verschijnsel eigenlijk heelemaal niet zeldzaam zou zijn. Wel vormen de verscheidene gevallen, die jaarlijks naar het instituut opgezonden worden, redelijkerwijze verondersteld, een onderdeel van het totale aantal in Nederland voorkomende gevallen, toch overschatte men de frequentie van de afwijking niet; genoeg grossiers in varkens en aan de slachthuizen keurmeesters en hulpkeurmeesters met scherp waarnemingsvermogen hebben in hun vaak 20- en 25-jarigen werkkring nog nooit een geval waargenomen.

Bij het levende dier kan onze aandacht erop gevestigd worden door het waarnemen van een vulva en eronder een scrotum, waarin

bij palpatie 1 of 2 testikelachtige organen blijken aanwezig te zijn. De leek denkt, wanneer hij zoiets ziet en niet op de hoogte is van het voorkomen der afwijking, te doen te hebben met een zeug, die een liesbreuk heeft. Deze vergissing is te begrijpen als men weet, dat een varkensscrotum geen hals heeft en dus een grootere overeenkomst met een breukzak toont.

Indien we niet slechts die gevallen van hermaphrodisie, waarin het dier zoowel mannelijke als vrouwelijke gameten voortbrengt, als echte of ware hermaphrodisie beschouwen (in tegenstelling met alle overige, aan minder strenge voorwaarden voldoende gevallen van zg. pseudohermaphrodisie), maar eenvoudig ieder dier hermaphrodiet noemen, dat duidelijk ontwikkelde mannelijke en vrouwelijke geslachtsorganen bezit, of deelen daarvan, dan zal weldra blijken, dat theoretisch denkbare grensgevallen, die door de onvolkomenheid der definitie niet gerangschikt zouden kunnen worden, ons practisch, d. w. z. in de voorkomende gevallen, geen moeilijkheden zullen opleveren. Want hoezeer ook de verschillende deelen van het genitaalapparaat in sterk uiteenlopende graden van ontwikkeling aanwezig kunnen zijn, het is opmerkelijk, dat het grootste gedeelte der hermaphrodiete varkens, in grove trekken beschouwd, een vrij uniform anatomisch beeld laat zien, dat geen twijfel overlaat voor de beslissing of er al of niet mannelijke en vrouwelijke deelen van het genitaalapparaat aanwezig zijn.

Na makroskopisch onderzoek zien we in zulke gevallen onmiddellijk met een hermaphrodiet te doen te hebben, want steeds vinden we een uterus bicornis (met vagina), terwijl de gonaden bijna altijd geheel of gedeeltelijk vorm en consistentie van een testis vertoonen. Hierbij zijn vele variaties mogelijk, bijvoorbeeld beide gonaden zijn volledig testes, of slechts 1, terwijl de andere dan ovarium of ovario-testis kan zijn. In het laatste geval, dat ook beiderzijds kan voorkomen, is het gehalte aan ovariaalweefsel sterk uiteenlopend, tusschen 0 en 100 %. Het meest komt voor: 2 testes en 1 testis en 1 ovariotestis. Bij de 15 gevallen die ik als assistent bij prof.

KREDIET heb onderzocht, heb ik geen enkel zuiver ovarium aangetroffen ; KREDIET heeft ze echter meermalen ontmoet.

Het testisweefsel kenmerkt zich door de aan dit orgaan eigen sappige weekheid en bruinachtige kleur ; de consistentie is in lang gefixeerde organen min of meer gummiachtig. Het vertoont den normalen buisjes-bouw, maar het zaadepitheel is sterk afwijkend van dat van den normalen testis, want de buisjes zijn van binnen bekleed met een « indifferēt » epitheel, dat bijna nooit rijpingsstadia vertoont. Het vormt een vaak draderig syncytium met vacuolen. Er is geen differentiatie, dus ook geen cel van Sertoli. De buisjes van een dergelijken sterielen testikel zijn dus niet seminifeer. Ontstaan uit de medullaire strengen, komen ze met het germinatieve deel van de gonade overeen. Ze blijven, in vergelijking met normale testes, tegenover het interstitium gewoonlijk in ontwikkeling ten achter, want in een intersexentestis (met of zonder ovariaalweefsel) is het interstitium, met name de cellen van LEYDIG, buitengewoon sterk ontwikkeld, zò sterk, dat in de microscopische coupe deze cellen vaak de helft, niet zelden zelfs meer dan de helft, van het gezichtsbeeld uitmaken. Ze zijn heel duidelijk polygonaal, sterk eosinophiel en bezitten een typische excentrische kern. De tunica albuginea der gonade is in den regel goed ontwikkeld. Er tegenaan of erin ligt een enkele keer een min of meer van de rest afgescheiden smalle strook kleinere buisjes, die volgens KREDIET uit corticale strengen zijn voortgekomen.

Tegen de testis aan, maar ook wel eens los ervan, bevindt zich een lange epididymis, die zonder een cauda te vormen in de ductus deferens kan overgaan. Zij is dan een eindweegs in het lig. latum uteri te volgen, waar zij tot een gekronkelde zaadleider wordt, die naast de baarmoederhoorn te vinden is, dan in den wand van het corpus uteri, de cervix en de vagina te volgen is tot de inmonding in den sinus urogenitalis.

In de gevallen waar KREDIET een gonade vond uit enkel ovariaalweefsel, stelde hij vast, dat de bouw hiervan in beginsel

overeenstemt met die van een normaal ovarium. Er zijn te onderscheiden: zona vasculosa, zona folliculosa, kiemepitheel. Echter komen deze deelen niet steeds voor in het soms zeer geringe ovariale aandeel van de ovariotestis.

Primairfollikels en blaasjes van DE GRAAFF komen in allerlei grootten voor, maar tot eirijping en bersting en corpus luteumvorming komt het niet, of in ieder geval uiterst zelden. Degeneratieverschijnselen in verschillende vormen spelen een groote rol bij de intersexengonade; zij treden het eerst op aan de eicel van de primaire follikel, of aan de groeiende follikel, zoodat KREDIET bij geen enkel blaasje van DE GRAAFF een gezonde eicel vond. Alle follikels en blaasjes gaan atretisch te gronde.

KREDIET beschrijft verder hoe de granulosa gaat degenereren en vervolgens processen optreden, die tot resultaat hebben de vorming van een corpus atreticum cellulosum, fibrosum of kysteuze lichamen. De kysten kunnen bijzonder groot zijn (vele c. m's), zelfs zoo dat men haast niets anders ziet dan kysten.

Aan de ovariotestis kunnen we soms alle zone's van den eierstok vinden, of wel is het ovariale deel alleen aanwezig in de vorm van een kleine hoeveelheid stroma en enkele kleine primairfollikels, maar deze laatste ontbreken ook dikwijls geheel en dan wijst slechts een kleine plek stroma op de aanwezigheid van ovariaalweefsel.

De gonaden bevinden zich aan het einde der uterushoornen. Deze laatste zijn meestal zeer goed ontwikkeld en in hun verloop darmachtig gekronkeld zooals ook bij het normale varken voorkomt. De lengte alleen is wat kleiner. Het einde gaat soms over in een kort oviduct, dat na enkele cm.^s blind eindigt, of ook is er wel eens niets van een oviduct te vinden; de gonade is dan een testis of ovariotestis. Beide hoornen zijn niet steeds in gelijke mate ontwikkeld en het is van belang, reeds hier erop te wijzen, dat de mate van ontwikkeling van de uterus niet, zooals men geneigd zou zijn te onderstellen, afhankelijk is van de aanwezigheid van ovariotestis of testis. Zijn de gonaden testes, dan kunnen de cornua even goed.

ook wel eens zelfs beter ontwikkeld zijn dan wanneer er ovariotestes (of ovaria) zijn. (KREDIET). De hoorns zijn soms dunwandig met wijd lumen en gevuld met een stijfslachtig secretum. Een corpus uteri is in den regel aanwezig, evenals een cervix, die zich door een verdikking verraadt. De vagina kan geheel aanwezig zijn, met vulva en clitoris, maar eindigt naar achteren ook wel eens blind, zoodat er geen vulva is.

Ook ontbreken de zgn. pseudozaadblaasjes (PICK) nooit of hoogst zelden. Zij zijn te vinden tegen de ductus deferens aan, gedeeltelijk in den vaginaalwand gelegen. Zij monden in de ductus deferentes uit.

De studie der morphologie van het geslachtsapparaat der intersexen gaf geen voldoende zekerheid omtrent de rol, die de gonaden spelen ten opzichte van de overige deelen van het geslachtsapparaat. Staan deze laatste onder directen (ev. hormonalen) invloed der kiemklieren?

Castraties, zoomede transplantaties van testes resp. ovaria, hebben bij normale dieren de nauwe betrekking aangetoond, die er bestaat tusschen de kiemcelbereidende organen eenerzijds en de overige deelen van het geslachtsapparaat. ja eigenlijk het geheele lichaam anderzijds. Het is overbodig hier de vele gevolgen van castraties ten opzichte van lichaam en geest te memoreeren; zij zijn bij onze huisdieren genoegzaam bekend.

Niet aldus de gevolgen der castratie van de hermaphrodieten. Een systematisch onderzoek diende te worden verricht, om te weten welke de invloed der gonaden bij een intersex op het verdere genitaalapparaat was. Twee mogelijkheden waren te verwachten overeenkomende met de opvattingen, die men over den aard der dubbelgeslachtelijkheid van deze dieren kan hebben. Moet men ze beschouwen als een dooreenmenging van mannelijke en vrouwelijke eigenschappen, waarvan de eerste door mannelijke, de tweede door vrouwelijke factoren worden beheerscht, of zijn het individuen, die evenals de normaalgeslachtelijke één genitaalapparaat bezitten, dat

we gewend zijn als een eenheid te beschouwen, maar nu niet van het mannelijk of vrouwelijk geslacht, doch van een dier, welks geslacht tusschen beide in staat, dus van een intersex in den zin van GOLDSCHMIDT.

Zou de eerste opvatting juist zijn, dan zouden de « mannelijke » deelen van het genitaalapparaat moeten atrophieeren na wegname van de testes, de baarmoeder zou er zich niets van aan moeten trekken. Was evenwel de tweede opvatting de ware, dan zou ont-nemen van beide gonaden, van welken aard ze ook zouden zijn, onvermijdelijk een geheele atrophie van het aanwezige genitaal-apparaat ten gevolge moeten hebben.

In de « Acta Veterinaria Neerlandica » tome 1, fasc. 1, 1933. « Kastration intersexueller Säugetiere », uitgave Boekhoven Utrecht, beschrijft KREDIET uitvoerig 21 gevallen van castratie van intersexen, hoofdzakelijk varkens (ook enkele geiten). De moeilijkheid bij dit onderzoek is, dat men niet, zooals bij normale dieren, precies den toestand kent vòòr de castratie. Wel kunnen we bij de operatie iets zien van enkele der geslachts-organen, maar zeker niet volledig en het is ook niet mogelijk bij de operatie van ieder onderdeel een proefstukje voor microscopisch onderzoek uit te nemen. Van den uterus is dat bijv. mogelijk, niet van de protata disseminata.

Slechts een uitgebreide ervaring en kennis van het geslachts-apparaat der intersexen maakt het mogelijk, met inachtneming van het noodige voorbehoud, een oordeel uit te spreken over de vraag of in een bepaald geval een orgaan als gevolg der castratie geatrophieerd is, of dat het nooit beter ontwikkeld aanwezig is geweest.

KREDIET komt tot de slotsom, dat alle onderdeelen van het intersexueele geslachtsapparaat beïnvloed worden door het wegnemen der gonaden. Niet alle deelen toonen dit even sterk; het duidelijkste zijn atrophie en regressie aan den uterus waar te nemen en wel aan het oppervlakte-epitheel, het epitheel der klieren en de muscularis.

De regressie van den ductus deferens is zeer duidelijk, maar

bij de accessoire geslachtsorganen ondervond KREDIET meermalen moeilijkheden bij de beoordeeling. Niettemin is er geen twijfel aan of ook dit deel van het geslachtsapparaat atrophieert onder invloed van de castratie.

Bij de intersexueele geiten is de atrophie minder duidelijk zichtbaar dan bij varkens. Zeer belangrijk is de bevinding, dat de gevolgen ten opzichte van de atrophie niet afhankelijk zijn van den aard der gonaden, die weggenomen worden. De volgende voorbeelden mogen dit illustreeren.

Wordt 1 der testes weggenomen, dan volgt er geen atrophie van den uterus; die treedt pas op als beide testes verdwijnen.

Is er een testis en een ovarium (of ovariotestis) en neemt men het ovarium (of ovariotestis) weg, dan brengt de testis blijkbaar voldoende hormoon voort om den uterus op peil te houden, of indien het een jong dier betreft, den uterus nog te doen groeien. Wegnemen van 1 testis en achterblijven van ovariotestis of ovarium, worden natuurlijk ook niet door regressie gevolgd.

Uit de castratieproeven bij intersexueele varkens en geiten bleek duidelijk genoeg, dat het geheele genitaalapparaat als één geheel, eigen aan het geslacht van het dier, moest worden beschouwd. Welke ook de aard en samenstelling der beide gonaden waren, wegname ervan had evenals bij normale dieren atrophie en regressie van het geheele genitaalapparaat ten gevolge. Vermoed zou dus kunnen worden dat evenals een testiculair (mannelijk) hormoon het masculine genitaalapparaat beheerscht, en ovariale (vrouwelijke) hormonen dit de vrouwelijke geslachtsorganen doen, bij een intersexueel dier een intersexueel hormoon in het spel zou kunnen zijn. Er moest dus een onderzoek ingesteld worden naar de hormonale oorzaak van het tot ontwikkeling komen en in stand houden van het genitaalapparaat der intersexueele dieren.

Ook hier waren twee mogelijkheden te veronderstellen:

- 1°. er is een intersexueel hormoon;
- 2°. er zijn mannelijke en vrouwelijke hormonen, die samenwerken.

De belangrijkheid van de endokrinologie in het algemeen en in dit geval in het bijzonder die der geslachtshormonen, wettigen een korte bespreking van wat vooral in de laatste 10 jaren over deze stoffen bekend is geworden; een meer dan overvloedige literatuur sluit volledigheid, die trouwens niet in de bedoeling van dit proefschrift ligt, uit.

HOOFDSTUK II.

DE GESLACHTSHORMONEN.

Dat de gonaden, behalve hun zuiver germinatieve werking, waaronder verstaan wordt het voortbrengen van rijpe geslachts-cellen, ook niet direct germinatieve invloeden op het dier uitoefenen, is reeds langen tijd bekend. Bij vele diersoorten (vooral onze huisdieren) heeft in het bijzonder de castratie van het mannelijke dier, en verder wat het vrouwelijke betreft het varken, om economische redenen een uitgebreide toepassing gevonden. En dit niet alleen omdat het totale bevruchtend vermogen van een groep dieren, die normaliter uit een vrijwel gelijk aantal mannelijke en vrouwelijke exemplaren bestaat, bij de mannelijke een niet te gebruiken overmaat oplevert, zelfs bij een intensief begeerde en nagestreefde aanwas, maar bijzonderlijk omdat door de castratie de dieren geschikter worden voor de vleeschproductie en handelbaarder als trekdier. Ook de castraties van den man hadden een veelal praktisch doel, (eunuchen), of werden door den godsdienst voorgeschreven.

In algemeene trekken is het wetenschappelijk onderzoek van de werking, die de gonaden op het organisme uitoefenen, in de volgende étappen geschied :

1° *stadium*. Men probeert de door castratie verloren gegane eigenschappen terug te brengen door transplantatie (implantatie) van gonaden.

2^e stadium. Men tracht bovengenoemd effect te bereiken door inspuitingen van extracten der gonaden. Nadat ook dit gelukt is, en dus het bewijs geleverd is, dat in de gonaden één of meer stoffen voorkomen, die de bedoelde eigenschappen bij het gecastreerde dier opnieuw doen verschijnen, gaat men over tot de derde étape.

3^e stadium. Men probeert de stof, die in uiterst kleine hoeveelheden in de gonade voorkomt, door middel van fijnere chemisch-fysische methoden zoo zuiver mogelijk te bereiden, totdat men de kristalvorm heeft verkregen. Indien het dan nog gelukt, de chemische formule der stof te bepalen, is de mogelijkheid van synthetische bereiding daar.

Aan de periode van systematische bestudeering van het geslachtshormoonvraagstuk gaan twee apart staande onderzoekingen vooraf, namelijk die van BERTHOLD en van BROWN SEQUARD. In 1849 publiceerde de eerstgenoemde (uit Göttingen) zijn implantatie-proeven bij hanen. (1) Hij plaatste een testikel van een haan bij een gecastreerden haan in de buikholte (in onmiddellijke aansluiting aan de castratie), en nam waar, dat het dier zijn haankarakter volledig behield. Hij kwam hierdoor tot de slotsom, dat de invloed van den testis door het bloed op het organisme moet zijn overgedragen, namelijk: « durch deren Einwirkung auf das Blut, und dann durch entsprechende Wirkung des Blutes auf den allgemeinen Organismus überhaupt, wovon allerdings das Nervensystem einen sehr wesentlichen Teil ausmacht. »

Men merke op, dat BERTHOLD, hier in het geheel niet spreekt over de wijze, waarop het bloed die werking over zou kunnen brengen. Later, in den bloeitijd der hormoonleer, toen een ware hormoonkoorts de wetenschappelijke wereld aantastte, vond men het vanzelfsprekend, dat BERTHOLD aan een chemische stof gedacht zou hebben, tengevolge waarvan hij in vele leerboeken als de grondlegger der interne secretie wordt afgeschilderd. TRENDLENBURG (2) zegt: « Das Verdienst, die ersten Tierversuche

(1) Arch. für Anatomie u. Physiol. 1849; p. 42.

(2) Trendelenburg. "Die Hormone," J. Springer 1929. p. 1.

angesteld zu haben, die die Lehre der hormonalen Beeinflussung des Körpers und der Psyche von den Keimdrüsen aus fest begründeten, kommt dem Göttinger Physiologen BERTHOLD zu, usw.» Dit is echter te veel gezegd, want het is geenszins zeker, dat BERTHOLD aan een chemische stof (later hormoon genoemd: STARLING) heeft gedacht; wel is waar, wat TRENDELENBURG laat volgen, dat hij het eerst een in de physiologie volkomen nieuwe gedachte uitsprak, namelijk dat tusschen orgaan en lichaam, het bloed als overbrenger van den invloed op dat lichaam zou zijn ingeschakeld.

De eerste, die in de physiologie het hormoonbegrip heeft gevoeld, is de plantkundige SACHS geweest, die in 1880-1885 een stoffelijke correlatie tusschen deelen van de plant vermoedde (1). 40 jaar na de proeven van Berthold was het BROWN-SEQUARD (2), die zich zelf inspoot met testikel-extracten. Hij beweerde, reeds na de eerste inspuitingen de heilzame gevolgen eener algemeene opleving zoowel naar den geest als lichamelijk, te gevoelen. In hoever deze verjongende en versterkende werking wezenlijk in het spel is geweest, en of zij te danken was aan het extract dan wel aan suggestieve invloeden, is helaas niet uit te maken, aangezien BROWN-SEQUARD geen proeven bij dieren heeft genomen.

In 1900 toonde KNAUER (3) aan, dat bij gecasteerde vrouwelijke dieren de verloren gegane geslachtskenmerken terugkwamen, indien men hun ovaria implanteerde. Merkwaardig is, dat de studie der ovaria zich nu veel sneller ontwikkelde dan die der testes.

In 1910-1912 wist eerst ISCOVESCO (4), en kort daarna FELLNER (5) met behulp van organische oplosmiddelen extracten uit ovaria te bereiden, die bij castraten ingespoten, de gevolgen der castratie konden opheffen. Fellner extraheerde ovaria en placentae met alcohol, verdampte deze en nam het residu in

(1) F.W. WENT. Wuchsstoff u. Wachstum Proefschrift Utrecht 1927

(2) Arch. Anat. Physiol. norm. path. V serie 1,65,739: II,201,443,456,641.

(3) Arch. Gynak. (1900) N^o: 60, p. 322.

(4) C. r. Soc. Biol. (1912), deel 72 en 73. C. r. de l'Acad. des Sc. 1912,155,110

(5) Arch. f. Gynak. 1913, N^o 100, p. 641

water op. OKINTSCHIA (1914) wreef ovaria, follikels en corpora lutea af met zoutoplossing en glycerine, na 3 dagen filtreerde hij. De corpora lutea waren niet werkzaam, die van ovaria en follikels wel, in zooverre zij de atrophie van den uterus bij gecastreerde muizen verlangzaamden. HERMANN en FRÄNKEL (1915) bereidden hun preparaten met behulp van gefractioneerde destillatie in vacuo. Zij hielden hun methode geheim. Hun meening, dat het hormoon cholesterine-reacties geeft, is later gebleken onjuist te zijn.

Intusschen was de studie over den invloed der mannelijke gonade op het individu niet verder gevorderd dan de bewijzen van GUTHRIE (1), STEINACH (2) en SAND (1910), dat door transplantatie van testes bij hanen en ratten de geslachtskenmerken, die door de castratie waren verdwenen, weer terug konden keeren. Deze feiten stonden nu geheel vast. Wanneer we afzien van twee mededeelingen, namelijk die van BOUIN-ANCEL (3), die beweerden, dat ze den castratie-invloed op de genitaalorganen bij caviae konden voorkomen door subcutane injecties van glycerine-waterige extracten van testes, en van de mededeeling van PEZARD in 1911, (4), die een Orpington-kapoen tweemaal per week 5-10 cc. testikelextract van een binnenbeer gedurende eenige maanden inspoot en hierbij sterke kam en lelgroei, benevens kraaien en vechten constateerde (deze verschijnselen verdwenen na het stopzetten der injecties), dan valt tot 1928 geen vordering te melden op het gebied van onderzoek van het mannelijke geslachtshormoon. Ten opzichte van het vrouwelijke hormoon is het anders gesteld. Het spreekt vanzelf dat het van zeer groot belang is, over een gevoelige en gemakkelijke methode te beschikken om de hormoonwerking aan te toonen, temeer omdat, zooals we nu weten, de hoeveelheid hormoon in organen en weefsels veel en veel kleiner is dan eenig

(1) J. exper. Med. 1910, N^o 12, p. 269.

(2) Pflüger's Arch. 1912, N^o 144, p. 71.

(3) C.R. de l'Acad. d. Sc. 1906, N^o 142, p. 232 en 298.

(4) C.R. de l'Acad. de Sc. 1911, N^o 153, p. 1025.

chemisch quantum tot dusver in de physiologie bekend. Geen wonder dat de transplantatieproeven met testes zekerder resultaten gaven dan de injecties met testikelextracten, in de eerste plaats omdat de laatste methoden slechts een deel van de stof uit het orgaan haalt, ten tweede omdat de gebruikelijke test een betrekkelijk groote hoeveelheid hormoon vereischt.

Het was dan ook als een groote vooruitgang te beschouwen toen in 1917 STOCKARD en PAPANICOLAOU (1) een eenvoudige bronstreactie bij de cavia ontdekten, welke bestaat in het veranderen van het cellig karakter van het vaginaal secretum. Dit bestaat namelijk in den dioestrus uit epitheelcellen, leukocyten en slijm in verhoudingen, die individueel verschillend zijn. Als de bronst in aantocht is, worden de slijmdraden en leukocyten geringer in aantal, (pro-oestrus genoemd). Langzamerhand maken de kernhoudende epitheelcellen nu plaats voor kernlooze, verhoorde epitheelcellen, die zich met eosine sterk rood kleuren. Een uitstrijkpreparaat in het hoogtepunt van den oestrus bestaat dan uitsluitend uit die verhoorde epitheelcellen (Schollen genoemd); de kernhoudende epitheelcellen, het slijm en de leukocyten zijn verdwenen. In den metoestrus verdwijnen de schollen, en treden, soms plotseling, leukocyten en kernhoudende epitheelcellen weer op, later ook het slijm, en dan is het dioestrus-stadium weer bereikt. De oestrus verschijnt gemiddeld eens per week en duurt een of twee dagen. Foto N^o 1 geeft het beeld van den oestrus; aan de vrije oppervlakte zien we een verhoorde laag, aan de bovenzijde in het midden een schol. Toen eenige jaren later (1922) ALLEN (2) bij de muis, LONG en EVANS bij de rat aantonden, dat deze dieren op dezelfde typische wijze reageerden op inspuiting met vloeistof uit ovariale follikels, beschikte men over een eenvoudige, goedkoope en betrouwbare methode, die nieuwe wegen van onderzoek opende. Weldra brak de tijd aan dat men ook in andere weefsels het vrouwelijke

(1) Amer. J. Anat. (1917), 22, p. 225.

(2) Amer. J. Anat. (1922), 30.

geslachtshormoon, dat folliculine werd genoemd, aan kon toonen, en quantitative bepalingen kon gaan verrichten. LOEWE en LANGE (1) waren de eersten, die het vrouwelijke hormoon in urine aantoonde (1926). ZONDEK en ASCHHEIM (2) vonden in urine van gravidæ in 1928 bijzonder groote hoeveelheden follikelhormoon. LAQUEUR, DINGEMANSE en DE JONG (3) gingen nu na hoe tijdens de graviditeit het gehalte steeg tot aan, of tot onmiddellijk na den partus, om dan vrij plotseling te dalen. In Duitschland, Amerika en Nederland verbreedde en verdiepte zich inmiddels de kennis van het follikelhormoon, waarbij zich echter het betreuenswaardige verschijnsel voordoet van volkomen onnoodige namengeverij, ten deele veroorzaakt doordat de productie in handen van handelsondernemingen valt. Men oordeele slechts :

Theeline (Doisy, Thayer.), menformon (Laqueur. c.s.), progynon (Butenandt), femininine (Glimm u. Wadehn.), thylykinine (Voss u. Loewe.), emmenine (Browne, Collip.), oestrine of oestrogeen (Amerikanen), pregnandiol.

Het is gebruikelijk, een hormoon te noemen naar het orgaan, waarin het gevormd wordt (adrenaline, thyroxine). Neemt men dit beginsel als juist aan, dan zou follikelhormoon de beste naam zijn, omdat de eifollikels in ieder geval de voornaamste vormingsplaatsen zijn, en deze naam ook kan steunen op prioriteitsrechten. Wij geven echter de voorkeur aan een naam, waarin de betrekking tot het vrouwelijke dier tot uiting komt (thylykinine).

Deze stof werd door LAQUEUR c. s. gevonden in lever, melk, eieren, gist, honing, later ook in bloed, maar in veel geringere hoeveelheden. Ook in testes van het rund vond hij thylykinine, en in faeces. GLIMM en WADEHN (4) vonden het in urine van kinderen en van mannen. ZONDEK (5) vermeldt het voorkomen in plan-

(1) D. med. W. Schr. (1926) 52, p. 559.

(2) Klin. W. Schr. (1928) 7, p. 485.

(3) Ned. T. v. Geneesk. (1929) p. 767.

(4) Bioch. Zeitschr. 1930, deel 219, p. 155.

(5) Naturwissenschaften 1933, 20 Jan.

ten, in de bloeiwijzen, in aardappelen, rapen en in bitumen. Merkwaardig is het voorkomen in de ovaria van vlinders (1). SCHOELLER en GOEBEL (2) beweren, dat progynon (Schering-Kahlbaum) een groei-versnellende werking heeft op planten, zoo op Hyacinthen, Calla, Convallaria, KÖGL echter, die een groot aantal stoffen op de groeireactie van Went heeft onderzocht (3), o. a. ook gekristalliseerd folliculine en progynon, wijst erop, dat van deze twee stoffen alleen het laatste een positieve reactie geeft, en dit mogelijk te wijten is aan onzuiverheid, met name een verontreiniging met auxine.

Nog valt een belangrijke bevinding te melden: in 1930 vinden LAQUEUR c. s. in het bloed van kankerlijders veel meer thelykinine dan in normaal bloed (4), hetgeen LOEWE en VOSS aanleiding gaf om kankertumoren zelf op hormoongehalte te gaan onderzoeken. Inderdaad vinden ze in 1932 per K. G. tumorweefsel (alleen niet-genitale kankers werden onderzocht) 125 M. E., dat is veel meer dan in ieder ander orgaanweefsel. SILBERSTEIN en FELLNER vinden, waarden, die hiermee veel overeenkomen: humane carcinoom 84 M. E., muizencarcinoom 200 M. E., muizen-sarcoom 200 M. E.

Voor we terugkeeren tot het mannelijke hormoon, willen we van het vrouwelijke, waar in de laatste jaren zeer veel over is bekend geworden, eerst eenige belangrijke chemische en biologische eigenschappen vermelden.

Chemische-physische eigenschappen.

Physisch is het gedrag van het hormoon langzaam aan bekend geworden door de uitkomsten van de vele extracties, waaruit zich later de bereidingswijzen hebben ontwikkeld. Het is oplosbaar in alcohol, aceton, ether, in olijf- en sesamsolie, echter bijna onop-

(1) Bioch. Zeitschr. 1932, deel 244, p. 4.

(2) Bioch. Zeitschr. deel 240, p. 1.

(3) Hoppe-Seyler. 1933. deel 216, Heft 1-2.

(4) Arch. f. Gynak. 1930, deel 141, p. 225.

losbaar in petroleumether. Aanvankelijk meende men (FELLNER), dat de werkzame stof uit ovaria niet in water oplosbaar was, want alleen met alcoholische extracten kreeg men goede resultaten. Men dacht aan een lipoiede natuur en sprak van « Sexuallipoide ». Later is gebleken (LAQUEUR c.s.), dat na reiniging der extracten het hormoon wel degelijk in water oplosbaar is, en wel hoe zuiverder het extract, hoe beter (1 en 2). Zij maakten niet gebruik van alcoholische extracten van het geheele ovarium, maar van de minder vreemde stoffen bevattende follikelvloeistof. Nog vlugger ging de zuivering der preparaten, die uit urine verkregen waren (geen vetten, lipoïeden, eiwitten). De zuiverste vorm wordt verkregen door uitkristallisatie, een ingewikkelde behandeling, waarvan de beschrijving buiten de bedoeling van dit proefschrift valt; DOISY vermeldt zijn methode uitvoerig in de *Journal of Biological Chemistry* 1930, deel 86, p. 499. Ongeveer op den zelfden tijd gelukt het ook BUTENANDT (1929), het hormoon in kristalvorm te verkrijgen, evenals LAQUEUR (1930). De scheikundige formule kon nu bepaald worden, deze bleek te zijn $C_{18} H_{22} O_2$, dit is namelijk wat DOISY c. s. noemen theeline, BUTENANDT progynon en LAQUEUR menformon. Het is een éénwaardige alcohol en bevat een ketongroep. Het smeltpunt is 240° (Laqueur) of 249° (Doisy-Thayer) (3). Een jaar later, in 1931, vinden DOISY en THAYER een kristallijn product met de formule $C_{18} H_{22} O_3$, dat echter half zoo actief is in oestrogeen opzicht als theeline. Zij noemen het theelol, het zou een driewaardige alcohol zijn met smeltpunt $274^{\circ}C$. Naar alle waarschijnlijkheid is deze stof identiek met het door BUTENANDT beschreven follikelhormoonhydraat (4), dat ook een driewaardige alcohol met formule $C_{18} H_{24} O_3$ is en ook een veel hooger smeltpunt bezit dan $C_{18} H_{22} O_2$, namelijk $279^{\circ}C$. Ook de kristallijne stof door COLLIP en BROWN in 1931 uit placentaë

(1) Laqueur, *Deutsche Mediz. W. schr.* 1926, deel 52, p. 4

(2) Zondek u. Brahm. *Klin. W. schr.* 1925, deel 4, p: 2445:

(3) *J. of Biol. Chemistry.* 1931, deel 89, p. 655:

(4) Hoppe-Seyler. 1933, band 216, Heft 1-2.

gewonnen, en door hen emmenine genoemd, is hoogstwaarschijnlijk ermee identiek.

Het staat wel vast, dat de bronstverwekkende eigenschap niet aan één stof toekomt; BUTENANDT vond reeds in 1932 twee isomeeren met de formule $C_{18}H_{24}O_2$, die hij γ - en β -follikelhormoon noemde; SCHWENCK en HILDEBRANDT (1) beschrijven een δ -follikelhormoon met dezelfde formule. GIRARD merkt echter op, dat ook H-armere verbindingen in merrie-urine voorkomen: $C_{18}H_{20}O_2$ en $C_{18}H_{18}O_2$ (hippuline en equiline genoemd), die ook oestrogeen werken bij gecasteerde knaagdieren.

Nadat dus gebleken is, dat een aantal stoffen uit het dierlijk lichaam oestrogeen zijn, valt het op, dat de formule's daarvan zeer weinig uiteen loopen, hetgeen doet veronderstellen, dat ze allen afkomstig zijn van één stamvorm. THAYER, DOISY c. s. schreven reeds in 1931, bij de vondst van theelol naast theeline: « in view of the chemical and physiological similarities it seems probable that both are derivatives of the same mothersubstance. »

$C_{18}H_{22}O_2$ (theeline) is werkzamer dan $C_{18}H_{24}O_3$ terwijl $C_{18}H_{24}O_2$, door de reductie uit theeline bereid, 4-5 malen sterker werkt. Het theeline is waarschijnlijk een phenantreen-derivaat. De structuur van het molecuul is met groote waarschijnlijkheid vastgelegd door BUTENANDT(2) en ZIMMERMANN(3)

Plaats van Vorming.

HALBAN was de eerste die wees op den invloed der placenta op de secundaire geslachtskenmerken (4). ALLEN-DOISY, ZONDEK-ASCHHEIM, LOEWE-VOSS, EN FELLNER vinden in foetale en moederlijke placenta groote hoeveelheden follikelhormoon, totaal veel meer dan in ovaria. Is de placenta de stappelplaats van het in de ovaria gevormde hormoon?, of bouwt de placenta zelf hormoon op?

(1) Naturwissensch. 1932, deel 20, p. 49.

(2) Hoppe-Seyler 1934, Band 223.

(3) Hoppe-Seyler 1935, Band 233.

(4) Arch. f. Gynäk. 1905, Nr 75, p. 353.

VON PROBSTNER (1) beschrijft het volgend geval: een vrouw wordt in de tweede maand der graviditeit gecastreerd voor tumoren. Voor de operatie was in de urine de normale hoeveelheid follikelhormoon aanwezig, die direct na de operatie echter verdwijnt, maar één maand post operandum verschijnt weer folliculine in de urine, de hoeveelheid ervan neemt in dezelfde mate toe als bij een normaal individu, en bereikt ten slotte de normale hoeveelheid van zwangeren-urine. Twee dagen post operandum is er nog veel follikelhormoon, na twaalf dagen weinig en na achttien dagen zeer weinig. De placenta blijkt de gewone hoeveelheid te bevatten. Hier blijkt dus wel duidelijk, dat de placenta zelf het hormoon heeft gevormd, alleen zou men nog kunnen tegenwerpen, dat in dit bijzondere geval de placenta de rol van het ovarium heeft overgenomen, zij hoeft niet altijd hormoon te vormen. Beschouwt men echter de zeer groote hoeveelheid hormoon tijdens de graviditeit, dan is het al heel waarschijnlijk, dat deze op rekening van de placenta moet worden gesteld.

BUTENANDT veronderstelt, dat de 3-waardige alcohol theelol = follikelhormoonhydraat = emmenine, die in urine en placenta worden gevonden, hun grootere werkzaamheid verkrijgen door hun omzetting in $C_{18}H_{32}O_2$, hetgeen in het ovarium zou gebeuren: follikelhormoon.

Biologische Eigenschappen.

Het oestrogeene vermogen, door Allen-Doisy toegepast voor testmethode, is ook basis geworden voor de quantitative bepaling. Laqueur c.s. geven als positieve reactie aan, dat het vaginaal secretum, uitgestreken en gekleurd, minder dan 5 % leukocyten moet bevatten, of géén leukocyten (2). Later, in 1932 (3) deelen zij den oestruscyclus in 8 stadia in, van a tot h. Het laatste stadium, h dus,

(1) Endokrinologie 1931, Band VIII.

(2) N. T. v. Geneesk. 1929, p. 767:

(3) Bioch. Zeitschr. deel 250, p. 448.

vertoont volgens hen het geheele epitheel kernloos, hetgeen, zooals zij erbij voegen, « practisch niet voorkomt, evenmin als het totale ontbreken van leukocyten. » Mijn eigen ondervinding op dit gebied is hiermee in tegenspraak, en ik zou juist willen zeggen : « het volkomen schollenstadium, zonder eenige leukocyt, en ook zonder een kernhoudende epitheelcel, en eindelijk zonder eenig slijm, komt als regel voor ». Daarom is het ook overbodig, een bepaald percentage epitheelcellen of leukocyten als criterium aan te nemen (5 % wil natuurlijk niet anders zeggen dan : heel weinig.) en is er alles voor om als eisch te stellen : enkel schollen. Houdt men aan deze eisch vast, en gaat verder steeds op dezelfde manier te werk, dan verkrijgt men goed vergelijkbare resultaten. De werkzaamheid van een preparaat wordt aangegeven door het aantal muiseenheden per gewichtseenheid. Voor een directe vergelijking van gevonden waarden is het absoluut noodzakelijk, dat steeds in alle onderdeelen van het proces dezelfde methoden worden gevolgd, het beste door één persoon. Zoo zal de manier van inspuiten (oliepreparaat, waterpreparaat, aantal injecties per dag enz.) stipt eender moeten geschieden. Vooral is zeer belangrijk, dat steeds hetzelfde celbeeld in de vaginalsecreta als criterium voor een positieve of negatieve reactie genomen wordt ; de beste waarborg voor het uitsluiten van persoonlijke verschillen wordt bereikt door één persoon steeds hetzelfde werk te laten doen. Een groote moeilijkheid is ook de verschillende gevoeligheid der muizenstammen, die men als proefdier gebruikt. Tal van onvolkomenheden maken, dat deze quantitative bepaling, zelfs wanneer men de fouten door het gebruik van een groot aantal proefdieren tracht uit te schakelen, geen wiskundig zuivere uitkomsten kan geven.

Behalve op de vagina heeft het follikelhormoon invloed op den uterus. Foto 7 geeft het beeld van den uterus van een twee maanden geleden gecastreerden muis. Het orgaan is zeer dun geworden, en bleek ; de muscularis is sterk atrophisch, alsook de klieren, waarvan het epitheel zeer laag is. Foto 8 is van een dier uit dezelfde

groep castraten, en dat tien dagen lang in oestrus is gebracht door inspuiting van thylokinine-preparaten. Na afloop der injecties viel bij sectie de uterusvergroting direct op, en ook de roode kleur. In het mikroskopisch beeld zien we een flink ontwikkelde muscularis en ook het epitheel der klieren heeft zijn normale hoogte terug verkregen, vooral die laatste verandering is in het oog vallend.

LAQUEUR en anderen is het gelukt, door inspuiting van groote hoeveelheden follikelhormoon vergroting van de mannelijke mamma te verkrijgen, na stopzetting der injecties trad melkafscheiding op. De invloed, die thylokinine op het ovarium heeft, is nog niet voldoende bekend; wel nam HAUPTSTEIN (1) waar, dat zeer groote doses ervan, bij normale dieren ingespoten, een beschadigende werking op het ovarium uitoefenden, bestaande in het uitblijven van follikelgroei en van corpora lutea. De vruchtbaarheid kwam terug, zoodra met de injecties werd opgehouden. FREUD (2) kent aan het kristallijne follikelhormoon (menformon) een hypertrophieerende werking op het gladde spierweefsel van het mannelijke geslachtsapparaat toe, vooral van glandula vesicularis en ductus deferens: paradoxe werking. Zelf heb ik dezen invloed niet kunnen waarnemen, en BEUTHNER, BERNHARD en FELS (3), die de werking van follikelhormoon bij mannelijke muizen hebben bestudeerd, komen tot de slotsom, dat bij infantiele dieren (5-10 gr.) dit hormoon degenererend werkt op gonade en accessoire geslachtsklieren, terwijl bij volwassen dieren de genitalia onveranderd bleven, en de voortplanting normaal. Deze werking zou volgens MOORE en PRICE (4) gebeuren via de hypophyse. Gonade en hypophyse zouden reguleerend op elkaar werken. Indien er teveel hormoon in het lichaam komt, dan zou de hypophyse, die de gametogenese en de hormoonvorming in de gonade regelt, geremd worden.

(1) Endokrinologie X, p 321.

(2) Werken Genootsch. Nat.-Heel-Geneesk. 1933, p. 62.

(3) Endokrinologie, 1928, II, p. 406.

(4) Proceed. Soc. Exp. Biol. and. med. 1930, vol. 28, p. 38

Behalve van locale invloeden, is er ook sprake van een algemeen invloed op het organisme; de stofwisseling zou door follikelhormoon met 15-20 % verhoogd worden (1).

CSEPAI (2) vergelijkt follikelhormoon met de andere hormonen in hun werkzaamheid ten opzichte van bloeddruk, bloedsuikergehalte, enz. en meent een plaats in de hormoonrij eraan toe te moeten kennen dicht bij het insuline.

KUN en BURCKHARDT (3) spotten seniele mannelijke ratten met progynon in en zagen, dat de kale huidplekken, die bij deze dieren zooveel voorkomen, verdwenen. Ook het bloed onderging veranderingen, er trad verhooging van het haemoglobine-gehalte op en vermeerdering van het aantal roode bloedlichaampjes.

Na deze uitweiding over het vrouwelijke geslachtshormoon komen we terug op het mannelijke. Zooals gezegd, had de kennis hierover zich na 1910 nagenoeg niet uitgebreid, en deze stilstand duurde tot 1928. Tegen de dertiger jaren ontwikkelt zich namelijk een intensieve hormoonstudie, vooral in Amerika. In 1926 was SMITH daar begonnen de hypophyse te onderzoeken (4), bijna gelijktijdig met ZONDEK en ASCHHEIM (5) en BROUHA en SIMONNET in Europa. Het werk van SMITH, voortgezet en aangevuld door ENGLE, EVANS (6), SIMPSON, HISAW en RIDDLE bracht rijpe vruchten voort: in weinig jaren wordt de invloed der hypophyse op de gonaden bekend.

In 1929 vestigen CORNER en ALLEN (7) de aandacht op de « progestational proliferation » van den uterus, door corpus

(1) Von Arvay. Biochem. Zeitschr., deel 237, p. 199.

(2) Endokrinologie 1929.

(3) Pflüger's Archiv, 1932, deel 230, p. 776.

(4) Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1927, deel 87, p. 97.

(5) Klin. Wochenschr. 1927, VI, p. 248.

(6) Amer. J. Physiol. 1927, deel 80 en 81.

(6) Amer. J. Physiol. 1929, deel 89.

(7) Amer. J. Physiol. 1929, deel 88.

luteum-extracten teweeggebracht. Na bevestiging dezer proeven door GOLDSTEIN en TATELBAUM (1) gelukt het niet alleen den Amerikanen WINTERSTEINER en ALLEN (2), maar ook BUTENANDT (3) en DE JONG en LAQUEUR (4) in 1934 het progestine zuiver te bereiden en de formule vast te leggen ($C_{21}H_{30}O_2$).

Evenzoo zijn het ook Amerikanen, die de studie van het testiculaire hormoon krachtig ter hand nemen. In 1928 gaan MAC GEE, JUHN en DOMM (5) en ook MOORE stieren-testes met alcohol extraheeren, de alcohol droogdampen en het residu in benzol opnemen. Deze benzol-oplossing geeft bij injectie soms heftige ontsteking, zoodat zij als stock-solution moest worden beschouwd, waaruit na zuivering injicieerbare preparaten werden gemaakt.

Tot nog toe was de invloed der gonaden alleen nagegaan aan de secundaire geslachtskenmerken der hoenders. Het was MOORE, die een nieuwe test-methode aangaf, welke als volgt wordt uitgevoerd: een cavia wordt gecastreerd met behoud van den bijbal. Na een bepaalden tijd vertoonen de spermatozoïden, die men uit den bijbal in een zout-oplossing opvangt, geen beweging meer, tenzij men testikelextract had ingespoten, want dan bleef de motiliteit langer bestaan. Deze test voldeed niet, evenmin als reeds door STEINACH opgemerkte veranderingen, door hormoonwerking opgewekt, zooals daar zijn: vet-afzetting van het dier na castratie, verandering van het haarkleed, afnemende helderheid der oogen (brightness), gestoorde psychische eigenschappen (geen vechtlust, geen libido sexualis, apathie) en minder bewegelijkheid (revolving cages). Al deze laatste kenmerken werden door MOORE onvolgende als reagentia op de aanwezigheid van mannelijke geslachts-hormoon bevonden.

(1) Amer. J. Physiol. 1930, deel 91, p. 14.

(2) J. of Biol. Chem. 1934, deel 107, p. 321.

(3) D. med. Wochenschr. 1934, deel 60, p. 771.

(4) Biochem. Zeitschr. 1934, deel 270, p. 17.

(5) Amer. J. Physiol. 1928, deel 87 . p. 406 en 436:

De reeds bekende reactie van den hanenkam werd door MAC GEE, GALLAGHER en FUNK (1) weer met succes opgenomen, en heeft zich, mede door het werk van LOEWE-VOSS, LAQUEUR c. s. en anderen, tot een zeer bruikbare methode ontwikkeld.

Eenige jaren later is deze hanenkamproef opzij gestreefd door de zaadblaasreactie, welke bestaat in het door den hormooninvloed weer opgroeien van de geatrophieerde zaadblaas bij het gecastreerde knaagdier. Speciaal VOSS en LOEWE hebben deze test zeer mooi uitgewerkt tot wat zij noemen: Cytologische Regenerations-Test, afgekort tot C.R.T.

Bereiding.

Terwijl de Amerikaansche onderzoekers hun preparaten uit testes van stieren maakten, begonnen VOSS en LOEWE het mannelijk hormoon te zoeken in urine van mannen. De bereiding uit testes was niet zoo eenvoudig, want een extractie met water geeft over het algemeen weinig of niet werkzame preparaten, daarvoor komen in testikelweefsel te veel vetten en vet-achtige stoffen voor. MAC GEE, MOORE en GALLAGHER (1) extraheerden de fijngemalen testes eerst met 95 % alcohol gedurende enkele dagen. De alcohol werd dan ingedampt tot een geconcentreerde oplossing en deze met benzol geëxtraheerd. De benzol mengt zich met de alcohol, maar na toevoeging van water scheidt de benzol zich van de waterige alcoholische oplossing af, aangezien benzol niet in water oplosbaar is. Nu moet dit benzolisch extract verder gezuiverd worden, eerst van fosfo-lipoid (lecithine), dit wordt gedaan met behulp van aceton bij lage temperatuur, waarbij genoemde stoffen zich tegen den glazen wand van de kolf afzetten. De heldere aceton-oplossing bevat nu nog neutraalvet en cholesterineesters; zij wordt drooggedampt en het residu in hexaan opgenomen.

(1) Amer. J. Physiol., 1928, deel 87 en 88.

De hexaan wordt met koude verdunde alcohol uitgetrokken en deze alcohol, waarin vet zoo goed als niet oplost, (het hormoon wel) nog eens ter verwijdering van de laatste hoeveelheid vet met versche hexaan gewasschen. In de alcoholische oplossing blijft dus het hormoon in eenigszins gezuiverden toestand achter. Deze oplossing wordt drooggedampt en het residu in ether opgenomen. De ether wordt dan geschud met loog, want het hormoon heeft een bazisch karakter. Ten slotte wordt de ether met oleum olivarium of oleum sesami gemengd, en later op een waterbad weer verdreven. De olie, waar het hormoon goed in oplosbaar is, is gemakkelijk injicieerbaar. Het is deze methode, die ik bij de bereiding van werkzame mannelijke hormoonpreparaten steeds heb gevolgd (zie hoofdstuk III, B.).

FUNK (1) gebruikte voor de testis-extractie chloroform; hij maakte het weefsel eerst luchtdroog en extraheerde in een SOXHLET-apparaat.

De bereiding van het hormoon uit urine is aanmerkelijk eenvoudiger, wegens het ontbreken van eiwitten, vetten en vele andere stoffen, die in de weefsels voor komen. FUNK gebruikte ook voor de urine-extractie chloroform. Hij beweert, dat het hormoon op deze wijze alleen goed is te extraheeren, als vooraf de urine goed zuur is gemaakt. De methode FUNK wordt nog gevolgd door KABAK (2), die bij 7,5 Liter urine, 0,5 Liter rookend zoutzuur voegt. Bij 60° C. kookt de chloroform, wordt afgekoeld en valt terug in de urine. Na 6-10 uren is de extractie voltrokken. Zoowel FUNK als KABAK gebruikten de hanenkamproef; van den eersten onderzoeker is de stelling afkomstig, dat de beoogde reactie beter gelukt met urine dan met testikel-extracten, terwijl KABAK zich onderscheidt door de oprechte vermelding, dat: « vele experimenten mislukten ».

De extractie met benzol is betrekkelijk eenvoudig voor urine.

(1) Amer. J. Physiol. 1930, deel 92,

(2) Endokrinologie 1931, IX. p. 84.

Wel moet men kunnen beschikken over een grooten destilleerketel, om de groote hoeveelheden urine, die men noodig heeft, binnen niet al te langen tijd in te dampen, want al zijn de gonadale geslachtshormonen vrij sterk thermostabiel, toch verdient het aanbeveling, bij gebruik van groote hoeveelheden urine, die verscheidene uren indampen vereischen, de temperatuur lager dan 100° C. te kiezen, dus onder lagen druk te destilleeren. Een flink model waterstraalzuigpomp is voldoende, indien daarmede in den ketel een druk van 2,5 c.m. kwik gehaald kan worden; dan kookt de urine bij ongeveer 45° C. De nog goed vloeibare ingedampde urine (van 20 L. tot op ongeveer 0,75 L.) wordt dan geëxtraheerd met benzol, deze drooggedampt, het residu in ether opgenomen, met olie vermengd en de ether weer verdreven.

Biologische Eigenschappen.

Reeds spoedig bleek, dat zowel preparaten uit testes als uit mannen-urine de werkzaamheid van vrouwelijk hormoon bezitten (VOSS LOEWE, 1) en evenzoo hadden deze onderzoekers thelykinine-preparaten, die in mannelijk opzicht werkzaam waren. LAQUEUR c.s. hadden reeds in 1929 gevonden, dat, tegen hun verwachting in, gelijktijdige injectie van vrouwelijk en mannelijk hormoon, bronstverschijnselen bij gecastreerde vrouwelijke muizen gaf, dat dus het mannelijke hormoon het vrouwelijke niet in zijn functie belemmerde. Zij meenden juist een versterkenden invloed van het mannelijk hormoon op het vrouwelijk te mogen aannemen (2). Ook JUHN en d'AMOUR (3) besloten uit hun waarnemingen, dat beide hormonen op zichzelf staan, en elkaar niet beïnvloeden. Zij spoten bij kapoenen eerst mannelijk en vrouwelijk hormoon te gelijk in, en zagen dan, dat zowel kam en lellen groeiden (mannelijk

(1) Biochem. Zeitschr., deel 237-238, p. 214.

(2) Ned. Tijdschr. Geneesk. 1929, p. 767.

(3) Amer. J. Physiol. 1931, deel 95, p. 641.

hormoon) als het optreden van hennenveeren (vrouwelijk hormoon). Hetzelfde gebeurde, als van tevoren beide hormoonpreparaten gemengd werden. Hoewel dus de beide hormonen niet elkaar hinderen, doen zij dat wel elkaars vormingsplaatsen. We zagen immers al, dat thelykinine-toediening aan jonge mannelijke dieren de spermiogenese in den testikel tegenhoudt (zie pag. 28), en op overeenkomstige wijze onderdrukt het mannelijk hormoon de bronst bij normale vrouwelijke knaagdieren (1), zolang die injecties duren. Geeft men in het laatste geval, tegelijk dus met het mannelijk hormoon, ook hypophyse-extract, dan treedt wel bronst op. Dit steunt dus de opvatting van Moore en Price, zie blz. 28.

De omstandigheid, dat ongezuiverde preparaten tegelijk de mannelijke en vrouwelijke test geven, deed sommigen de vraag stellen, of er niet sprake zou zijn van één hormoon, dat beide werkingen vertoont, in de plaats van twee, die gemengd in beide geslachten zouden voorkomen. Zodoende kwamen unitariërs tegenover dualisten te staan. Het sterkste argument voor het afzonderlijk bestaan van twee hormonen is naar voren gebracht door LOEWE en VOSS (2). Zij wijzen erop, dat de verhouding der vrouwelijke tegenover de mannelijke werkingswaarden in fracties, bij het bereidingsproces ontstaan (en die dus verschillende zuiverheden bezitten,) steeds gelijke waarden moeten hebben, indien er slechts één hormoon bestaat, maar verschillende waarden, indien er twee zijn. Zie in verband hiermede hoofdst. III, C. Zij vonden bij fracties, op verschillende wijzen bereid, uiteenlopende waarden voor die quotienten, en wel wisselende tusschen 0,15 en 620. Op een enkele uitzondering na (MAINO en FRATTINI) (3) wordt dan ook aangenomen, dat er een mannelijk en een vrouwelijk gonaadaal geslachtshormoon bestaat. Voor het vrouwelijke hormoon heb ik den naam thelykinine gekozen; voor het mannelijke hormoon

(1) Ihrke-d'Amour. Amer. J. Physiol. 1931, deel 96, p. 289.

(2) Biochem. Zeitschr., deel 237 - 238, p. 214.

(3) Biochem. Zeitschr. 1932, deel 253, p. 202.

kunnen we kiezen tusschen: testikelhormoon, masculine en androkinine. Voor den eersten naam geldt hetzelfde bezwaar als voor den naam follikelhormoon, en om in analogie te zijn met het woord thelykinine komt het mij gewenscht voor, te spreken van androkinine.

Naast de specifieke werking op den geatrophieerden kapoenkam, bezit het androkinine nog enkele andere. VOSS en LOEWE (1 en 2) onderzochten de werking op de geatrophieerde zaadblaasjes (glandulae vesiculares, vroeger minder juist vesiculae seminales geheeten, want er komen geen spermieën in voor) van enkele knaagdier-castraten, vooral van muis en rat. Na de castratie worden deze organen uiterst klein (voor bijzonderheden zie hoofdst. III.A. bij het eigen onderzoek), voornamelijk doordat het secretum der klieren geresorbeerd wordt en het klierepitheel geen nieuw meer vormt. Het wordt volkomen inactief, de celhoogte neemt af, de cel wordt kubisch, er worden geen granula meer in gevormd en het protoplasma is dan slecht kleurbaar. Ook zagen VOSS en LOEWE veranderingen aan de mitochondriën en aan het apparatus reticulare. De gladde spiercellen in den wand der zaadblaas, [daar deze naam algemeen gebruikt is gebleven (ook in de Deutsche literatuur: Samenblasen), en geen andere naam werd voorgesteld, zullen we voortgaan, van « zaadblaas » te spreken,] worden ook kleiner, de chromatine minder gekorrelt. Na inspuiting van androkinine wordt de epitheelcel weer actief, alle genoemde veranderingen verdwijnen, er treden weer granula op, totdat eindelijk het secretie-proces weer in vollen gang is. Volledige teruggang naar de normale celhoogte is te bereiken.

Het maken van mikroskopische preparaten en het meten van celhoogten nemen echter vrij veel tijd in beslag, ook al hebben VOSS en LOEWE een betrekkelijk snelle methode van uitvoering aangegeven (snelle fixatie enz.). Het bepalen der celhoogten blijft

(1) Biochem. Zeitschr. 1930, deel 221, p. 461.

(2) Klin. Wochenschr. 1930, p. 481.

een moeilijkheid; we moeten een groot aantal metingen verrichten en daarvan het gemiddelde nemen. Verder is het voor het aantoonen van geringe werkzaamheid noodig, dat de atrophie volledig is geweest, maar de celhoogte, of liever gezegd de cellaagte, die hiervoor geëischt wordt, kan moeilijk aangegeven worden door een bepaald getal. Meet men namelijk de epitheelhoogten bij een tiental dieren, die op den zelfden tijd gecastreerd zijn, en waar we de kenteekenen eener volkomen inactiviteit waarnemen, dan zal men altijd verschillende getallen krijgen. De grensgevallen geven natuurlijk ook hier moeilijkheden.

VOSS en LOEWE merkten op, dat bij geringe hormoonwerking op het epitheel der zaadblazen, nog vóór we verschijnselen van secretorische werkzaamheid zien, in de epitheelcellen mitosen optreden (zie foto 6). Dit verschijnen van mitosen beschouwen zij als het gevoeligste reagens op de androkinine.

Van de accessoire geslachtsklieren ondergaat niet alleen de glandula vesicularis een hormonalen invloed; vele van de epitheelveranderingen, die we zoeven besproken hebben, gelden ook voor de glandula prostata (maar minder duidelijk) zoowel makroskopisch als mikroskopisch. Hetzelfde geldt voor het epitheel van den ductus deferens. De foto's 9 en 10 geven respectievelijk het beeld van epitheel van den ductus deferens van den gecastreerden muis, en het onder hormonalen invloed gereactiveerde epitheel bij een castraat. (Zelfde vergrooting).

De werkzaamheid van het hormoon wordt gemeten met muizen (ratten) eenheden, waarbij I M.E. (R.E.) de minimale hoeveelheid hormoon voorstelt die bij den gecastreerden muis (rat) nog een positieve reactie van de zaadblazen geeft. Een andere eenheid is de hanekam eenheid (K.E.), dat is de minimale hoeveelheid die de maten van de kapoenenkam een bepaald percentage doet toenemen. Deze laatste eenheid is natuurlijk veel grooter dan de muizen-eenheid.

Physisch-Chemische Eigenschappen.

Deze zijn voor het mannelijk hormoon minder ver onderzocht dan voor het vrouwelijke. Voor de oplosbaarheid in lipoiden-oplozende vloeistoffen mag hetzelfde gezegd worden als voor thelykinine, alleen is androkinine veel beter oplosbaar in petroleum-ether. Verder is androkinine beter oplosbaar in benzol dan thelykinine, en slechter in alcohol dan thelykinine.

De scheiding der twee hormonen in urine wordt beschreven door LAQUEUR (1), waarbij wordt uitgegaan van het feit, dat het mannelijk hormoon bazisch is, het vrouwelijk zuur. Bij het hoofdstuk « scheiding der hormonen in urine » (III C.) heb ik deze methode beschreven, want ik heb ze zelf bij mijn proeven toegepast. In 1933 publiceert WADEHN (2) een nieuwe methode ter scheiding, die ook berust op de verschillende reacties der hormonen.

De bereiding in kristalvorm van het mannelijke hormoon is enkele jaren na die van het vrouwelijke hormoon gelukt. BUTENANDT slaagde er het eerst in (3). Hij noemt de stof: « androsteron » en is bij zijn chemische onderzoekingen tot de conclusie gekomen, dat evenals bij het vrouwelijke hormoon een aantal nauw verwante stoffen de physiologische werkzaamheid vertoonen (hij gebruikte daarvoor de hanekamproef). Hij stelt de formule $C_{19}H_{30}O_2$ vast, en bepaalt het smeltpunt op $178^{\circ}C$. De O-atomen zijn aanwezig als een alcoholgroep (die niet zuur is zooals bij het vrouwelijke hormoon) en een ketongroep. De C-atomen vormen een viertal samenhangende zes-ringen. De verbinding is in tegenstelling met die van het thelykinine, verzadigd.

BUTENANDT is er ook in geslaagd uit het androsteron een stof te maken, die twee H-atomen meer bevat en physiologisch werkzamer is.

(1) Biochem. Zeitschr. 1930, deel 231, p. 1.

(2) Endokrinologie 1933, XII.

(3) Hoppe-Seyler 1934, Band 223 en 229.

Hoppe-Seyler 1935, Band 233 en 234

HOOFDSTUK III.

EIGEN ONDERZOEK.

Zoals bij iedere bepaling op biologischen grondslag, dient men eerst goed thuis te zijn in de reactie, waarop de quantitative bepaling steunt. We zullen zien, dat zoowel de methode voor aantoonen en bepalen van mannelijk als van vrouwelijk geslachtshormoon nogal omslachtig is. Een directe chemische kwalitatieve analyse is nog niet bekend, maar wellicht is het tijdstip, waarop een dergelijke vlugge methode gevonden wordt, niet ver meer af. De gewone gang van zaken in de physiologie is immers, dat eerst de biologische werking ontdekt wordt, en dat dan langzamerhand de chemicus zich van de stof meester maakt. Vooral het studiegebied der hormonen vindt meer en meer zijn centrum in het scheikundig laboratorium.

Het aantoonen der reactie bovenbedoeld heeft veel voorbereidende proeven en dus veel tijd gekost, ook omdat er talrijke bijzonderheden over mijn werkwijzen in verscholen zijn, zooals ik die later bij de definitieve bepalingen heb toegepast. Het komt mij wenschelijk voor, ze eenigszins uitvoerig mede te delen, wat tevens het voordeel heeft, dat ik bij de besprekingen der definitieve bepalingen niet in herhaling hoef te vervallen. Achtereenvolgens zal ik dan behandelen :

A. *Vorbereiding der proefdieren.*

Anatomie.

Castraties.

Veranderingen na de castratie, geschiktheid voor de reactie.

B. *Bereiding van hormoonpreparaten, en het aantonen van hun werkzaamheid.*

A. en B. worden eerst besproken voor het mannelijke hormoon, daarna voor het vrouwelijke.

C. *Scheiding der hormonen in urine.*

D. *Urine-onderzoek van het intersexueele proefdier.*

MANNELIJK HORMOON.

A. Anatomie.

Voor het aantoonen van het mannelijk hormoon werd gebruikt de na castratie geatrophieerde zaadblaas van de muis. Bijna steeds werden voor mijn proeven genomen witte muizen, slechts bij uitzondering zwarte. Normaal zijn de glandulae vesiculares (vroeger minder juist vesiculae seminales geheeten) bij de muis twee opmerkelijk groote melkwitte organen, die bij het openen der buikholte direct in het oog vallen; soms liggen ze iets dieper, en zijn dan bedekt door darmlissen. Tegen de breede basis aan ligt een deel der niet melkwitte prostaat. Van de basis af versmalt het iets afgeplatte orgaan zich, dat aan de top, waar het het smalst is, ombuigt en in een ronde aanzwelling eindigt. Het kan tot 1,5 c.m. lang zijn. De wand van de curvatura major is sterker gekarteld dan die van de curvatura minor. De klier is hol, en bijna altijd gevuld met een porcelijn-witachtig, vloeibaar secretum, dat zich bij de kleuring voor het mikroskopisch onderzoek sterk eosinophiel toont. De wand is betrekkelijk dun en bestaat van buiten naar binnen uit: adventitia, muscularis, epitheel. Dit laatste vormt in het lumen uitstaande plooien met vrije einden. Zoo'n plooi kan als een klep uitsteken en bij een coupe loodrecht op de lengte-as kan het schijnen, alsof een aparte afgesloten holte gevormd wordt. Dit is evenwel niet het geval, want de plooi heeft een vrij einde. Veelvuldig ziet men van de hoofdplooien, zijplooien uitgaan, die veel korter zijn. De plooien bestaan voornamelijk uit epitheel, het bindweefsel is er slecht ontwikkeld en alleen in de grootere plooien nemen we gladde spiercellen waar. (Zie foto N^o 3). Het knopvormig einde van de blaas heeft een klein lumen, dat uit spleetvormige ruimten bestaat, die tusschen de dicht tegen elkaar loopende dubbele epitheelplaten liggen.

Bezien we het epitheel mikroskopisch, dan blijkt dit éénlagig vrij hoog prismatisch te zijn, tusschen 16,5 en 18 μ hoog. De kernen bevinden zich ter halverhoogte van de cel, en verdeelen deze in een met haemaluin-eosine gekleurd preparaat in een donker gekleurd basaal en een perifeer lichter gedeelte, waarin zeer duidelijk de secreetgranula te zien zijn. (Zie foto N^o 3 en 4). De kernen zijn rond en staan vrij dicht bij elkaar; ze vormen vrijwel een rechte lijn. Soms zijn ze zijdelings iets samengedrukt. De chromatine is fijn gekorrelt, aan de kernwand iets opgehoopt; het aantal nucleoli bedraagt, voor zoover dit zonder specifieke kleuringen te bepalen is, 1 of 2.

De secreetgranula zijn vrij groot en in een met eosine gekleurd preparaat reeds bij matige vergrooting goed te zien.

Plastosomen komen voor in de vorm van mitochondriën, die veelal, min of meer evenwijdig aan elkaar, in de lengte-richting der cel liggen, vooral in de omtrek der kern en het basale celgedeelte, terwijl het perifere gedeelte ingenomen wordt door granula. De mitochondriën in foto N^o 5 zijn volgens de methode ALTMANN-KULL gekleurd. De fixatie van zeer kleine stukjes geschiedde in een mengsel van gelijke deelen osmiumzuur 2 % en kaliumbichromaat 5 %, de insluiting in paraffine; de coupe's werden 3 μ dik gesneden.

De kleuring, die in ROMEIS § 799 uitvoerig staat beschreven, komt neer op een behandeling met sterke saure-fuchsine onder verwarming. De kernkleuring geschiedt met toluïdineblauw. Na een voorzichtige differentiatie met pikrinezuur-oplossingen van verschillende sterkten, is na eenige oefening (waarbij het geluk ook een rol speelt) een fraaie groenblauwe kleur van het protoplasma te verkrijgen, waartegen de roode mitochondriën duidelijk afsteken.

Een groot nadeel is de sterke verwarming (tot dampvorming), waardoor de dunne coupe's belangrijk beschadigd worden. In plaats ervan wordt aangegeven een half uur verwarmen in de broedstoof bij 60° hetgeen minder schadelijk is, maar ook niet zoo sterk kleu-

rend werkt. Afgezien van de minder fraaie coupe als geheel, geeft de methode ALTMANN-KULL goede resultaten.

Met stukjes, die volgens REGAUD (kaliumbichromaat en formol) of volgens BENDA (chromozuur en osmiumzuur) werden gefixeerd, had ik geen succes.

Daar de bijzondere kleuringen veel tijd kosten, heb ik die van het apparatus reticulare niet uitgevoerd. VOSS en LOEWE hebben het echter duidelijk kunnen aantonen.

De hoogten der epitheelcellen werden gemeten door middel van een zich in het oculair bevindende mikrometer; bij ieder preparaat werden 20 metingen verricht en hiervan het gemiddelde genomen.

VOSS maakt in de zoo juist genoemde publicatie melding van het voorkomen van zg. basaalcellen, die slechts een geringe hoogte bereiken en die volgens dezen onderzoeker uit kunnen groeien tot normale epitheelcellen. Zij zouden uitgestooten cellen vervangen en VOSS meent dan ook overgangen tusschen deze basaalcellen en gewoon epitheel te hebben waargenomen. Ik heb deze laatste bevinding niet kunnen bevestigen. Wel zag ik enkele basaalcellen, maar zeker niet in groot aantal. Mijns inziens moeten we voorzichtig zijn met de beslissing, of we met een basaalcel te doen hebben; licht kunnen we een dwars getroffen bindweefsel of gladde spiercelkern, die iets terzijde van het interstitium is komen te liggen, voor een basaalcelkern aanzien. Een zuivere celbegrenzing zien we zelden en het komt mij voor, dat VOSS de beteekenis van dit soort cellen te hoog aanslaat. Aan de andere kant: in vele preparaten, die ik doorgekeken heb, zag ik slechts één mitose; maar die zien we in andere weefsels ook hoogst zelden, hoewel we daaraan toch de aanvulling van verloren gegane cellen in normaal weefsel moeten toeschrijven.

In coupe's, die door de lengte-as van het orgaan zijn genomen, vertoonen in den wand der zaadblaas de meeste gladde spiercellen zich dwars getroffen. Deze cellen moeten dus hoofdzakelijk, maar niet uitsluitend, circulair, loodrecht op de lengte-as verlopen.

Gangliën vinden we dikwijls naast de glandula vesicularis. Zij liggen aan haar basis, in de buurt van de prostaat en de ductus deferens, niet bij de top.

A. Castraties.

Deze werden, voornamelijk bij witte muizen, onder lichte ether-narkose verricht. De operatie kan geheel alleen gedaan worden. De abdominale castratie komt niet in aanmerking wegens den tijd, dien het kost om buikwand en huid te hechten. Toegepast wordt de scrotale castratie.

Nadat het diertje onder een omgekeerd glazen bakje, met een watje met ether onder narkose is gebracht, worden de inmiddels vier gereed gemaakte touwtjes aan de pootjes bevestigd en de muis in rugligging vastgebonden; onder het achterstel wordt een stukje watten gelegd.

Scrotum en anaalstreek worden nu met een watje met 70 % alcohol schoongemaakt. Met de vingers zijn de testes gemakkelijk uit de buik in het scrotum te duwen en worden met behulp van een tang met twee dunne, platte einden, die boven de testes het scrotum inklemt, op hun plaats gehouden. De huid van het scrotum is nu gespannen, en gemakkelijk in te knippen met een fijn, spits schaartje. Tunica dartos en tunica vaginalis communis worden gekliefd en de bal wordt na onderbinding van de zaadstreng met een draadje naaigaren (in 70 % alcohol bewaard), verwijderd. De geheele bijbal kan worden meegenomen. Wanneer men de tang tegen het lichaam houdt aangedrukt, behoeft men niet bang te zijn voor prolapsus der ingewanden. Wel moet men voorzichtig zijn om niet te hard aan de ductus deferens te trekken, anders komt de zaadblaas teveel in het open lieskanaal te liggen en kan dan licht geïnfecteerd raken. Een algemeene infectie of peritonitis hoeft men niet te vreezen, de muis is zeer weinig gevoelig voor infectie, en indien deze al plaats heeft, is er veel kans op lokaal blijven. Intusschen

is het duidelijk, dat met het oog op de reactie de zaadblaasjes niet ontstoken mogen zijn.

De stomp wordt afgedipt met 70 % alcohol en teruggebracht, vervolgens op dezelfde wijze de andere bal verwijderd.

Men kan ook de castratie verrichten zonder de tunica vaginalis te openen, maar dan is het moeilijker de ligatuur op de gewenschte hoogte aan te leggen en weet men ook niet of de geheele bijbal, die bij de muis nogal lang is, onder de ligatuur ligt. Ook zijn huid en tunica vaginalis communis eenigszins met elkaar vergroeid.

De wonden worden niet gehecht. De muis wordt na de operatie op schoon stroo gelegd. De sterfte is zeer gering; soms te wijten aan overgevoeligheid voor ether of een te hooge dosis ervan, hetgeen bij alléén werken voor kan komen. Een enkele keer treden abscessen op, soms tot bij de glandula vesicularis en de blaas; die dieren worden van de proeven uitgesloten. Tientallen zijn al dus te castreren, zonder dat er één sterfgeval optreedt. De algemeene toestand van het dier heeft niet in het minst te lijden. De castraten zijn rustig, ze vechten niet, wat bij normale mannelijke muizen zoo dikwijls voorkomt, en worden breed en zwaar.

A. Gevolgen der castraties.

Makroskopisch zijn de zaadblaasjes reeds zeer klein geworden, het secretum verdwijnt daarbij geleidelijk. Na 5 tot 6 weken, soms pas na 8 weken, zijn ze moeilijk terug te vinden en nog moeilijker uit te prepareeren. Ze zijn daan vaak maar 1 - 2 $\frac{m}{m}$ lang. Echter zijn na 4 weken niet alle zaadblaasjes tot de zelfde afmeting gereduceerd en dit feit sluit reeds een makroskopische beoordeeling van een zwak positieve reactie uit.

Behalve de zeer sterke teruggang van de zaadblaasjes zien we ook de prostaat bijna geheel verdwijnen, terwijl de ductus deferentes iets dunner worden. Het mikroskopische preparaat (zie foto N^r 2) geeft een goed beeld van de veranderingen, die hebben plaats gehad. Vooreerst de totaalindruk van het beeld: het vitale helder

gekleurde weefsel heeft plaats gemaakt voor een weinig contrastrijk, door haemaluin dof gekleurd weefsel, waarin vrijwel alle eosine ontbreekt. Niet alleen is de roode kleur van het vroeger sterke eosinophile secretum zoo goed als geheel verdwenen (doordat het secretum geresorbeerd wordt), maar ook het plasma kleurt er zich eerst slecht, later, d.w.z. na 6 weken, in het geheel niet meer mee. De geheele epitheelcel vertoont het beeld van inactiviteit, de kern is egaal en zeer donker gekleurd, de fijne chromatine-korreling is verdwenen. De cel is kleiner geworden, 5 weken na de castratie worden maten gevonden tusschen 10,96 en 12,60 μ . De epitheelplooiën zijn lager geworden, het bindweefsel is toegenomen, in de volgens VAN GIESON gekleurde coupe's ziet men nu in de plooiën duidelijk bindweefselfibrillen verlopen, die men normaal slechts met moeite kan ontdekken. De muscularis is veel smaller geworden, de gladde spiercellen zijn korter, de kernen korter en donkerder, de chromatine niet meer fijn-korrelig. Het lichaam van de epitheelcel mist de zôneverdeeling, de kern ligt nu in het midden van de kubische cel; de secreetgranula zijn volkomen verdwenen: dezelfde kleurmethode voor de mitochondriën laat zien, dat deze celdeelen veel korter zijn dan bij het normale beeld. Volgens LOEWE-VOSS zou het apparatus reticulare ook veranderd zijn.

Een eigenaardig verschijnsel is het volgende: de normale epitheelcel schijnt op het oog drie maal zoo lang als breed, de geatrophieerde cel echter maakt een kubischen indruk, terwijl toch de hoogten volgens metingen niet meer dan een derde is verminderd, nl. van 17 op 11 à 12. Is de breedte van de cel ook veranderd? Wel liggen de kernen in het castraten preparaat ruimer van elkaar dan in het normale beeld, maar dit zou te verklaren zijn door hun kleinere afmetingen en tevens door een geringer totaal aantal kernen, waarvan geen aanmaak meer plaats heeft.

Wat de geschiktheid voor de reactie betreft, ben ik van meening, dat 4 weken na de castratie de dieren voor injecties in aanmerking komen. Drie weken is te kort; wel is er dan al een duidelijke atrophie opgetreden (de eerste verschijnselen ziet men trouwens al eenige dagen post operationem), maar meer zekerheid geeft een tijdsduur van 4 weken. Dan zijn er geen plaatsen meer, waar het epitheel nog niet onder invloed van de atrophie is gekomen; het epitheel heeft overal dezelfde laagte bereikt. Toch is dit nog niet het eindpunt der regressie, dit wordt na 8 weken bereikt, waarna de toestand stationnair blijft.

B. Bereiding van Hormoonpreparaten en het aantoonen van hun werkzaamheden.

De testes, voor de bereiding gebruikt, waren afkomstig van volwassen, meest oudere stieren, die op het slachthuis te Utrecht geslacht werden. De organen werden aldaar gedurende enkele dagen bij lage temperatuur (4° C.) bewaard, totdat een voldoende hoeveelheid verzameld was. De epididymis werd verwijderd, de tunica albuginea afgeprepareerd, wat bij oudere testes, waar het testiculaire interstitium vrij stevig met de kapsel in verbinding staat, niet zoo gemakkelijk plaats heeft. Bij elke bereiding werd alleen het overgebleven testisweefsel gebruikt; het werd gewogen en dan in een vleeschmolen gemalen.

TESTISPREPARAAT N^r I.

Ruim 1 K. G. aldus verkregen testisweefsel wordt gedurende 4 dagen met 2,5 L. alcohol 96 % gemengd; eenige keeren per dag wordt krachtig geschud. Dan wordt de vloeistof afgeheveld en ingedampt in een zuigkolfflesch tot 125 cc., waarbij veel neerslag optreedt. Er wordt gezogen met een waterstraalpomp. De 125 cc. vloeistof worden met 250 cc. benzol krachtig geschud, waarna het mengsel 1 dag blijft staan. Daarna wordt 100 cc. water toegevoegd; de scheiding tusschen de alcohol en de benzol is niet goed te zien, zoodat er gecentrifugeerd moet worden. De verkregen benzollaag wordt ingedampt tot 40 cc. (neerslag), waarna er 250 cc. aceton bij wordt gedaan, gevolgd door 1 dag staan. Toevoeging van 60 cc. water dient om de benzol te scheiden. Hierbij lost het neerslag voor een deel op; maar ontstaan er geen twee lagen vloeistof, maar één vloeistoflaag met er boven een schuimlaag en een licht vlokkelig neerslag op den bodem. Bij kamertemperatuur wordt gefiltreerd, daarna komt de kolf in een koudmakend mengsel van ijs en zout bij -6° C. gedurende 18 uur. Bij 0° C. wordt weer gefiltreerd, want

bij het uitvriezen is er vrij veel neerslag opgetreden. Het filtraat is een heldere lichtgele vloeistof. Na droogdamping in een zuigkolf wordt daarin 200 cc. hexaan gedaan, waaraan 150 cc. alcohol 70 % toegevoegd wordt. Ook nu volgt flink schudden en één nacht staan. Door de waterige alcohol treedt er direct scheiding op. Deze alcohol wordt met een pipet afgezogen en viermaal kort met 50 cc. hexaan gewasschen. De overblijvende alcohol is helder.

De 200 cc. hexaan worden tweemaal met 100 cc. alcohol 70 % uitgetrokken, en deze alcohol 5 maal met 50 cc. hexaan gewasschen. Totaal blijft nu over $150 + 200 = 350$ cc. alcohol. Deze wordt drooggedampt en het residu opgelost in 50 cc. aether. Dan wordt 10 cc. 10-normaal NaOH toegevoegd, en geschud. De aether wordt afgegoten en de loog nog enkele malen met aether uitgetrokken. De gezamenlijke aetherporties worden gemengd met 20 cc. oleum olivarum; door verwarming in een porceleinen schaal op een waterbad wordt de aether verdreven. De olie levert het preparaat N^r 1.

4 muizen uit een groep van 6, die vier weken geleden gecastreerd waren, worden subcutaan met dit preparaat ingespoten, terwijl de overblijvende twee als controle dienst doen.

N^r 1 krijgt in 7 dagen 9 injecties van 0,2 cc.

Sectie: het rechter zaadblaasje is dadelijk te vinden, het is kleiner dan normaal, maar ongetwijfeld groter dan van een castraat. De kleur is melkachtig wit (door het secretum). het linker zaadblaasje is veel kleiner.

N^r 2 krijgt 13 injecties van 0,3 cc., totaal 3,9 cc.

Sectie: rechts in een flink ontwikkeld zaadblaasje met secretum aanwezig, links is het veel kleiner.

N^r 4 en 5 worden zonder ingespoten te zijn, op den zelfden tijd als 1 en 2 afgemaakt.

Sectie: de zaadblaasjes zijn heel klein en doorzichtig en bevatten zeer zeker geen secretum.

N^r 6 krijgt 2 weken later dan N^o 1 en 2 de eerste injecties.

Gedurende 8 dagen 11 injecties van 0,3 cc.

Sectie: De zaadblaasjes zien er geheel uit als van een gecastreerd dier.

N^o 7 krijgt in 6 dagen 11 injecties van 0,3 cc.

Sectie: de vergrooting der blaasjes is twijfelachtig.

Waarom de dieren met de minste injecties en de kleinste doseering het best hebben gereageerd, is niet duidelijk. Wel is gebleken, dat verscheidene dagen achter elkaar, en zeker 2 maal per dag, een dosis van 0,3 cc. te groot is. Verder bleek, dat bijzondere maatregelen genomen moeten worden, die ten doel hebben, de injectie-opening te sluiten, omdat anders de olie naar buiten komt en de doseering oncontroleerbaar wordt, terwijl het niet onmogelijk is, dat door de vette olie, die zich over de huid verspreidt, de gezondheidstoestand van het dier heeft te lijden. De ouderdom van 14 dagen van het preparaat kan, zooals later zal blijken, niet de oorzaak zijn van de makroskopisch negatieve reacties van N^r 6 en 7.

TESTISPREPARAAT II EN III

1,1 K. G. fijn gemalen testikelweefsel wordt in eene groote flesch gedurende 4 dagen met 2,5 L. alcohol 96 % samengebracht, terwijl eenige keeren per dag goed wordt geschud. De afgehevelde alcohol en de alcohol, die verkregen wordt door de weefselkoek krachtig uit te persen, worden over een porceleinen zuigfilter met een hard papierfilter gefiltreerd. De heldere alcohol wordt in een glazen kolf tot 200 cc. ingedampt met behulp van een waterstraalzuigpompje, dan met 250 cc. benzol gemengd, en flink geschud. Den volgenden dag wordt er 100 cc. water bij gedaan om te scheiden, maar we zien geen duidelijke grens optreden. Na centrifugeeren treedt echter een goede scheiding op. De alcoholhoogte wordt

nu nog eens met 50 cc. benzol uitgetrokken; de totale hoeveelheid benzol wordt ingedampt tot 10 cc. en dan met 50 cc. aceton gemengd. In het zelfde tijdvak van bovenstaande bereiding werd een tweede hoeveelheid testikelweefse (1,3 K.G.) op overeenkomstige wijze geëxtraheerd, alleen met dit verschil, dat de benzol zoo goed als droog werd gedampt en het residu opgenomen in 200 cc. aceton. Deze aceton werd gevoegd bij de eerste hoeveelheid aceton. Vervolgens werd gefiltreerd en het filtraat gedurende 24 uur bij -8°C . bewaard. Een filtratie gaf nu een heldere gele oplossing. Deze wordt drooggedampt en het residu opgenomen in 240 cc. hexaan, waaraan 140 cc. alcohol 70 % wordt toegevoegd. De alcohol laag van 180 cc. wordt drie maal met 60 cc. hexaan gewasschen; er blijft over een heldere alcoholische oplossing. De hexaan laag van 240 cc. wordt drie maal met 140 cc. alcohol 70 % uitgetrokken, deze 3×140 cc. alcohol worden niet met hexaan gewasschen en blijven iets troebel.

De ééne helft van de 180 plus 3×140 cc. alcohol wordt drooggedampt, in 60 cc. aether opgenomen, en geschud met 10 cc. 10 % natronloog. De loog wordt nog tweemaal met versche aether geschud. Na menging van de aether met olie wordt de aether verdreven en de olie vormt het preparaat II.

De andere helft van de $180 + 3 \times 140$ cc. alcohol wordt eerst met hexaan gewasschen, totdat de oplossing helder wordt; verder wordt precies zoo gehandeld als boven, alleen geschiedde de bewerking 3 weken later; de alcoholische oplossing heeft zoolang gestaan. Deze alcohol levert het preparaat III.

Ingespoten worden de volgende proefdieren:

N^o 14 is controle en krijgt 6 dagen lang $2 \times 0,3$ cc. oleum olivarum, totaal 3,6 cc. Sectie: de blaasjes zijn heel klein, een paar $\frac{\text{mm}}{\text{m}}$ lang en niet te onderscheiden van die van een gewonen castraat.

N^o 15 heeft in 6 dagen gehad 1,2 cc. preparaat II, $2 \times$ per dag 0,1 cc. Sectie: de blaasjes zijn heel klein en doorzichtig.

- en bevatten geen secretum. Misschien zijn ze iets groter dan van N^r 14, maar makroskopisch mag men niet tot een positieve reactie besluiten. De hoogte van het epitheel is 13,50 μ .
- N^r 16 krijgt in 6 dagen 2,4 cc. van preparaat II, 2 \times per dag 0,2 cc. Sectie : de blaasjes zijn veel groter dan van een castraat, bijna 1 cc. lang, indien gestrekt. Bij afknippen vloeit een wit secretum af. De epitheelhoogte is 15,48 μ .
- N^r 17 krijgt in 6 dagen 3,6 cc. preparaat II. Sectie : er zijn zeer groote gevulde vesiculae, ruim 1 cc. lang, van het linker is het einde ver omgebogen naar beneden en iets vergroeid. De epitheelhoogte is 14,40 μ .
- N^r 18 is een controle, en wordt niet ingespoten. Sectie : de vesiculae zijn iets groter dan gewoonlijk bij een castraat ; de muis zelf is echter ook groot. In de blaasjes zit nog een weinig vloeistof, die echter niet melkwit, maar kleurloos ziet. De epitheelhoogte is 10,98 μ .
- N^r 19 krijgt 1,7 cc. in 4 dagen van preparaat III. Sectie : de blaasjes zijn zeer veel groter dan bij N^r 18, zeker 2 \times zoo groot. Ze bevatten veel secretum, dat melkachtig van kleur is. De sectie vond s'morgens plaats, nadat den vorigen avond de laatste injectie gegeven werd. De epitheelhoogte is 13,50 μ .
- N^r 20 krijgt 1,9 cc. preparaat III, in 5 dagen. De sectie heeft plaats 27 uur na de laatste injectie. Er zijn groote blaasjes, bijna zoo groot als bij een normaal dier en ze bevatten wit secretum (Hun gewicht is 198 gr. Het epitheel is 14,76 μ hoog.
- N^r 21 krijgt 2,1 cc. van preparaat III, in 5 dagen. De sectie gebeurt 36 uur na de laatste injectie. De blaasjes zijn vrij klein

en bevatten weinig secretum ; zij wegen 80 mg. De epitheelhoogte is 13,50 μ .

N^r 8 heeft in 7 dagen 11 injecties van preparaat II gehad, totaal 3,3 cc.

N^r 9 heeft in 7 dagen 11 injecties van preparaat III gehad, totaal 3, 6 cc.

Bij de secties N^r: 8 en 9 blijken de zaadblaasjes bijna zoo groot als normaal te zijn, en grooter nog dan van N^r 1 en 2. Beide zijn ook sterk gevuld met secretum. De epitheelhoogten zijn resp. 16,67 en 16,74 μ .

Gaan we nu eens na, welke conclusies te trekken zijn uit de resultaten van deze injecties, dan blijkt, dat N^r 15 een mikrosopisch positieve reactie van het epitheel geeft, terwijl makrosopisch de reactie twijfelachtig is, immers voor de epitheelhoogte van een 5 weken-castraat werd nooit een hooger waarde gevonden dan 12,60 μ . Bij N^r 16 zijn beide reacties overduidelijk positief. Van N^r 17 is de makrosopische reactie sterker dan van N^r 16, terwijl voor de mikrosopische juist het omgekeerde geldt ; ook hier zijn beide reacties positief. De controle N^r 18 heeft zaadblaasjes, die iets grooter zijn dan gewoonlijk, de gevonden epitheelhoogte geeft echter de zekerheid, dat het epitheel volledig geatrophieerd is, zoodat in dit geval de noodzakelijkheid van het mikrosopisch onderzoek duidelijk naar voren komt. N^r 19 en 20 zijn overtuigend positief, terwijl de gegevens over N^r 21 erop wijzen, dat 36 uur na de laatste injectie de resorbtie afgelopen is en de teruggang van het epitheel reeds begonnen. Over N^r 8 en 9 moet nog dit opgemerkt, dat het mikrosopisch beeld daarvan volkomen overeenkomt met dat van een normale zaadblaas, alleen valt erin op het groote aantal mitosen. In vele gezichtsvelden zien we er 2 of 3, soms wel 5.

TESTISPREPARAAT IV.

9,5 Ons testisweefsel worden fijngemalen en in een wijmond-sche flesch met 2,5 L. alcohol 96 % overgoten, geschud en gedurende 4 dagen bewaard. Nadat de alcohol volledig uit het weefsel verwijderd is (persen), wordt tot een heldere oplossing gefiltreerd, dan wordt het weefsel nog eens met nieuwe alcohol uitgetrokken, ook gefiltreerd, en aldus wordt een totale hoeveelheid van $3\frac{1}{4}$ L. alcoholisch extract verkregen. Deze wordt tot 150 cc. ingedampt, dan 300 cc. benzol toegevoegd, gevolgd door 50 cc. water. Door centrifugeeren wordt de benzol gescheiden, drooggedampt, en 200 cc. aceton toegevoegd. Deze wordt gefiltreerd en nu volgt weer het uitvriezen in een koudmakend mengsel gedurende 18 uur, waarbij zich vrij veel vet-achtige substantie tegen het glas afzet. De heldere oplossing wordt drooggedampt; in de flesch wordt dan 200 cc. hexaan en 150 cc. alcohol 70 % gedaan. Er wordt eenige malen geschud en langzamerhand treedt de scheidingslijn te voorschijn (de scheiding gebeurde in een scheidrechtter). De 150 cc. alcohol worden tweemaal gewasschen met 50 cc. hexaan, terwijl de 200 cc. hexaan tweemaal worden geextraheerd met 100 cc. alcohol 70 %. Totaal hebben we nu 350 cc. alcohol 70 %; deze worden drooggedampt en het residu in 50 cc. aether opgelost, deze aether-oplossing geschud met 10 cc. NaOH (10 %), en de loog nog tweemaal geextraheerd met aether. Als de loog bij de aether-oplossing komt, wordt deze heel donkerbruin van kleur. De aether wordt met olie gemengd en later weer verdreven.

De volgende 5-weken castraten worden met dit preparaat ingespoten:

N^r 22 krijgt in 6 dagen 9 injecties, totaal 2 cc. Sectie: de blaasjes zijn grooter dan van een castraat en bevatten weinig secretum. De epitheelhoogte is 18 μ .

N^r 23 krijgt in 8 dagen 13 injecties, totaal 2,8 cc. Sectie : de blaasjes zijn vrij groot en bevatten niet veel secretum. De epitheelhoogte is 17,64 μ .

N^r 24 krijgt injecties als N^o 23. Sectie : er zijn groote blaasjes, maar deze zien niet zoo wit (secretum) als men in verband met de grootte zou verwachten. De epitheelhoogte is 17,84 μ

N^r 25 en 26 zijn controle's. Sectie : de blaasjes zijn uiterst klein, en moeilijk terug te vinden. De epitheelhoogte is 11,52 μ resp. 12,24 μ .

N^r 27 krijgt in 6 dagen 11 injecties, totaal 2,4 cc. Sectie : de blaasjes zijn groot, 1 c.m. lang. Er schijnt niet bijzonder veel secretum in te zitten, en dit ziet niet zoo porceleinachtig als bij een normaal blaasje. De epitheelhoogte is 17,28 μ .

N^r 28 krijgt evenals N^o 27 2,8 cc. in 7 dagen. Sectie : de blaasjes zijn even groot als bij N^r 27 μ .

De resultaten dezer injecties bevestigen de vorige. Vooral de verhooging van het epitheel is hier heel duidelijk, en verschilt aanzienlijk met de hoogten van het epitheel der controle's. Nu gebleken is, dat de extracties effectief hebben plaats gehad, willen we eens zien of er geen vereenvoudiging in het proces der bereiding mogelijk is :

TESTISPREPARAAT V.

Op de gebruikelijke wijze wordt 1 K. G. testisweefsel verzameld en met enkele L.'s benzol gemengd. De extractie duurt 4 dagen. Aan het einde daarvan zien we een laag heldere benzol staan boven een laag roomachtige substantie, die heel licht lijkt. Bij een poging om de benzol vrij te maken, blijkt, dat dit heel moeilijk

gaat ; zelfs met een snelle centrifuge is de benzol slecht, in ieder geval gebrekkig en onvolledig uit die roomachtige laag te isoleeren, waardoor een belangrijk verlies van materiaal plaats heeft. Alleen de heldere benzol wordt gebruikt, ingedampt en verder op geheel overeenkomstige wijze behandeld als bij de vorige preparaten.

Met dit preparaat worden 2 muizen ingespoten, terwijl er 2 als controle dienst doen.

N^r 30 krijgt in 4 dagen 1,5 cc. (7 injecties) Sectie : de zaadblaasjes zijn vergroot, 0,8 c.m. lang en bevatten weinig secretum.

N^r 31 krijgt in 7 dagen 2,5 cc. (12 injecties). Sectie : de blaasjes zijn flink vergroot, 0,9 c.m. lang en bevatten wit secretum. De epitheelhoogte is 17,68 μ . Ook is hier duidelijk te zien, dat de prostaat goed ontwikkeld is.

Van controle N^r 32 (6 weken-castraat) zijn de blaasjes zéér klein ; van N^r 33 (10 weken-castraat) nog iets kleiner, nl. hoogstens 2 mm. lang. Verder is de prostaat niet terug te vinden, de klier van Cowper wel. De ductus deferens is dun.

RESULTAAT : ook met een directe extractie met benzol is dus een werkzaam preparaat te verkrijgen. Het voordeel van een extractie minder weegt echter niet op tegen de nadeelen van de sterke centrifugeering, die noodzakelijk bleek om de benzol helder te krijgen, en van het materiaalverlies.

Om te zien of de ouderdom van het dier, waarvan de testes als hormoonbron worden gebezigd, een groote rol speelt voor het gehalte aan hormoon, wordt het volgende preparaat gemaakt.

TESTISPREPARAAT VI.

De testes voor deze proef zijn afkomstig van jonge pinkstiertjes (onder het jaar oud). Op de gewone manier wordt bijna 1 K.G. weefsel geextraheerd, dus eerst weer met alcohol en dan met benzol. De afwerking van het preparaat heeft door een week ziekte ruim 3 weken geduurd.

Muis N^r 38 krijgt van dit preparaat 1,9 cc., nl. 16 injecties in 9 dagen, bijna geregeld twee keer per dag 0,1 cc. Sectie: er is wel vergroting der blaasjes, maar niet heel sterk.

N^r 39 krijgt 2,4 cc. in 11 dagen. Sectie: de zaadblaasjes hebben duidelijk gereageerd, maar ook niet sterk.

CONCLUSIE: Wel is dit preparaat iets ouder dan de vorige, maar daartegenover staat de lange duur der injecties, en gezien de makroskopisch betrekkelijk geringe reacties, is het waarschijnlijk, dat in de testes dezer jonge dieren minder hormoon aanwezig is dan in die van oudere stieren.

Nu we de zaadblaasreactie bij de muis voldoende hebben leeren kennen, willen we deze reactie ook eens bij de rat beproeven. De voorbereiding der proefdieren is geheel overeenkomstig met die bij de muis. Tegen den tijd, dat de atrophie der glandulae vesiculares is afgelopen (dat is na 5 weken), maken we het volgende preparaat:

TESTISPREPARAAT VII.

Drie verschillende hoeveelheden testisweefsel, totaal 12 K.G. worden met alcohol 96 % geextraheerd, de alcohol met benzol uit getrokken, en deze tot bijna droog gedampt. Vervolgens wordt het residu in aceton opgenomen en de aceton door uitvriezen van vet en vetachtige stoffen gezuiverd. Van de verkregen heldere acetoplossing wordt de aceton afgedistilleerd, en hexaan + 60 % alco-

hol toegevoegd. De alcoholaag wordt tweemaal gewasschen met versche hexaan, die na deze bewerking bij de eerste hexaan-hoeveelheid wordt gedaan. De alcohol wordt afgedestilleerd en het residu op de gewone wijze met ether, loog en olie behandeld; dit geeft het *preparaat VII a*.

De hexaan wordt nog drie maal met 60 % alcohol uitgetrokken, en deze alcohol geeft nu een *preparaat VII b*, dat waarschijnlijk niet zoo sterk is als VII a.

Met *preparaat VII a* worden twee muizen en twee ratten ingespoten, terwijl een muis en een rat als controle dienst doen.

Muis N^r 46 krijgt in 8 dagen 1,5 cc., in veertien injecties, dagelijks tweemaal 0,1 cc. Bij sectie blijkt er sterke glandulaire reactie te zijn, de blaasjes zijn overvloedig gevuld.

Muis N^r 47 is controle. De glandulæ zijn na 7 weken bijna niet meer terug te vinden.

Muis N^r 50 krijgt in 9 dagen 1,7 cc., in 16 injecties. Ook hier is veel secretie aanwezig, dus sterke reactie. De epitheelhoogte is 17,64 μ .

Rat N^r 5 krijgt in 6 dagen 3 cc., rat N^o 6 in 7 dagen 4 cc.

Beide blijken bij sectie groote gevulde zaadblazen te hebben, zeer veel grooter dan van de controle N^r 7, terwijl de prostaat ook duidelijk is te zien voor het bloote oog.

Preparaat VII b bevat zeker ook een behoorlijke hoeveelheid hormoon, want muis N^r 49, die in 8 dagen hiervan 1,6 cc. krijgt ingespoten, reageert met goed ontwikkelde zaadblazen, terwijl het epitheel een hoogte van 15,04 μ heeft verkregen.

Met de rest van *preparaat VII* (a en b worden bij elkaar gedaan) wordt getracht de kam-reactie bij een kapoen te verrichten. Daartoe worden bij een volwassen Sea-bright haantje de testes

	basis	hoogte	lengte	dikte		
29 April	3,35	2,2	6,—	1,75		
21 Mei	2,9	1,2	4,5	1,5		
9 Juni	2,9	0,75	3,8	1,15		
6 Juli	2,8	0,6	3,6	1,—		
15 Juli	2,8	0,5	3,5	1,1		
26 Juli	3,2	0,8	4,3	1,4		
30 Juli	3,3	1,1	4,6	1,5		
1 Sept.	3,0	0,5	3,7	1,1		
22 Sept.	2,9	0,5	3,6	1,05		
7 Oct.	3,35	1,0	4,4	1,4		
10 Oct.	3,4	1,2	4,7	1,6		
12 Oct.	3,4	1,2	4,8	1,6		
2 Nov.	2,9	0,6	3,7	1,05		
24 Dec.	2,8	0,6	3,7	1,—		

Twee kam-reacties bij een kapoen

	<i>Lel</i>						<i>Spoor</i>						<i>Lel</i>						<i>Spoor</i>					
29 April	4,7	3,6	0,15	0,5	0,4	0,6	4,05	3,2	0,2				3,1	2,9	0,17	0,5	0,4	0,7						
21 Mei	3,3	3,3	0,15	0,5	0,4	0,6	3,1	2,9	0,17	0,5	0,4	0,7	2,5	2,7	0,15	0,5	0,4	0,7						
9 Juni	3,0	3,0	0,15	0,5	0,4	0,55	2,5	2,7	0,15	0,5	0,4	0,7	1,95	2,5	0,2	0,5	0,4	0,85						
6 Juli	2,9	2,9	0,1	0,5	0,35	0,5	2,0	2,4	0,15				2,5	2,6	0,15									
15 Juli	2,35	2,35	0,1				2,5	2,6	0,15				2,85	2,6	0,15	0,6	0,55	0,85						
26 Juli	2,8	2,9	0,15				2,85	2,6	0,15	0,6	0,55	0,85	1,85	2,3										
30 Juli	3,2	3,1	0,15	0,5	0,5	0,7	1,85	2,3					1,8	2,3	0,15	1,0	0,6	0,6						
1 Sept.	2,2	2,5	0,1				1,8	2,3	0,15	1,0	0,6	0,6	2,6	2,7	0,15									
22 Sept.	2,4	2,4	0,1	0,8	0,6	0,6	2,6	2,7	0,15				2,8	3,0	0,15									
7 Oct.	3,2	3,0	0,1	0,8	0,6	0,6	2,8	3,0	0,15				2,8	2,95	0,15	1,0	0,6	0,6						
10 Oct.	3,3	3,4	0,15				2,8	2,95	0,15	1,0	0,6	0,6	1,9	2,5	0,1									
12 Oct.	3,3	3,4	0,15	0,85	0,6	0,6	1,9	2,5	0,1				1,8	2,5	0,1									
2 Nov.	2,6	2,8	0,1				1,8	2,5	0,1															
24 Dec.	2,3	2,7	0,1	0,8	0,6	0,6																		

Rechts

Links

Twee spoor- en lelreacties bij een kapoen.

De injecties voor de eerste reactie gebeuren van 15-26 Juli
(prep. VII)

De injecties voor de tweede reactie gebeuren van 29 Sept.-11 Oct.
(prep. VIII)

weggenomen (29 April). Na 23 dagen, na 42 dagen, na 69 dagen en na 72 dagen worden de maten van kam, lellen en sporen gemeten. De tabellen doen zien, dat vooral kam en lellen in grootte terug zijn gegaan, vooral de lengte en hoogte van den kam zijn sterk afgenomen. De kleinste maten vinden we 15 Juli, den datum waarop met de injecties wordt begonnen. Ook de kleur van den kam is geleidelijk veranderd en wel eerst naar paars-dofrood, terwijl dit later nog bleeker en fletser wordt. Makroskopisch is de grootte afname ook zonder meten duidelijk te zien. In het gedrag van het dier is een opvallende verandering gekomen: het zit veel in elkaar, is erg stil geworden en kraait in het geheel niet meer. De staart wordt iets lager gedragen.

De injecties hebben plaats van 15-25 Juli. Eerst wordt drie dagen 0,2 cc. gegeven en vervolgens 6 dagen lang 0,4 cc. De olie is gemakkelijk weg te wrijven, er gaat niets van verloren. Op 26 Juli worden metingen gedaan (zie tabel), waarbij blijkt, dat alle maten van kam en lellen zijn toegenomen. Op 26, 27 en 28 Juli wordt in totaal nog 2 cc. ingespoten, en op 30 Juli zijn de maten nog belangrijk toegenomen. Een maand later, op 1 September, blijken deze organen weer kleiner te zijn, en op 22 September vinden we bijna weer precies dezelfde afmetingen als op 15 Juli, dat is de datum, waarop we de kleinste castraat-maten hebben gevonden.

Om te zien of de reactie bij hetzelfde dier herhaald kan worden, wordt nog een hoeveelheid hormoon bereid, waarvan de bewerking hieronder volgt.

TESTISPREPARAAT VIII.

9,5 K.G. testisweefsel worden met 20 L. 90 % alcohol gemengd; na 5 dagen staan (een paar malen per dag wordt flink geschud), wordt de alcohol afgeheveld en het weefsel goed uitgeperst. De verkregen 21 L. vloeistof worden tot 100 cc. ingedampt (bij 50-55° C), die donkerbruin van kleur zien en nog goed vloeibaar zijn. Ze worden in een scheitrechter met 2 L. benzol gemengd en geschud, en na een uur

wordt water toegevoegd voor de scheiding. De benzol wordt nu drooggedampt; hij destilleert over bij 25-30° C., terwijl het waterbad een temperatuur heeft van 40° C. Het residu wordt opgenomen in aceton, en na het uitvriezen en filtreeren de aceton ingedampt, waarbij nog veel lipoid (lecithine) in de vloeistof aanwezig blijkt te zijn. Daarom wordt voor een tweede maal uitgevroren. De heldere aceton wordt dan drooggedampt, daarop volgen de bekende bewerkingen met hexaan en alcohol.

Met dit preparaat wordt dezelfde kapoen op 29 September ingespoten, de eerste dagen tweemaal 0,4 cc., de laatste dagen tweemaal 0,9 cc.; de totale hoeveelheid is hier grooter dan bij de eerste proef. Op 11 October heeft de laatste inspuiting plaats. We zien uit de tabel dat op 7, 10 en 12 October alle maten grooter zijn geworden, op 12 October zijn ze ook grooter dan de grootste maten die bij de eerste proef gevonden werden, en waarschijnlijk zullen de maten enkele dagen na 12 October nog iets zijn toegenomen. Na de injecties zoowel in Juli als in September, is de kapoen veel levendiger geworden, de kleur van kam en lellen is weer donkerrood geworden als van een haan.

Op 2 November, dus 3 weken na de laatste injectie, zien kam en lellen nog rood, maar reeds iets lichter. 12 October wordt 's morgens een paar maal kraaien gehoord en gezien, hetwelk zich de volgende dagen vaker herhaalt. Interessant is het, de maten van de sporen, vooral van de rechter te volgen. Op 22 September, als vrijwel de laagste castraat-afmetingen weer zijn bereikt van kam en lellen, blijkt de spoor grooter te zijn geworden. Trouwens op 6 Juli is er, als gevolg der castratie, geen invloed op de spoorgrootte waar te nemen. Bezien we verder nog de waarden op 12 October (op het einde der injecties, als kam en lellen sterk reageeren) en eindelijk op 24 December, dan valt onmiddellijk op dat de waarden op deze drie data volkomen gelijk zijn. Er volgt uit, wat trouwens al bekend was, 1° dat de spoor na de castratie grooter wordt, en 2° dat de injecties met hormoon geen invloed hebben gehad op zijn grootte.

De bevedering heeft weinig verandering ondergaan, en is, in tegenstelling met wat Trendelenburg hierover mededeelt (1), iets minder glanzend geworden. De staart wordt als kapoen iets lager gedragen en is niet zoo vol, terwijl op 8 October, dus 9 dagen na de eerste injecties, de algemeene levendigheid van het dier gepaard gaat met een goed gedragen staart en de sabel goed van stand is.

Op 24 December zijn de maten van kam en lellen weer geheel als die van een kapoen, de kleur is weer bleek-roze, en het gedrag van het dier mat.

De werkzaamheid van preparaat VIII werd vòòr de proef onderzocht bij muis 62, die een zeer goede positieve reactie gaf.

Inmiddels werden twee proeven genomen om na te gaan, of uit mannen-urine een werkzaam preparaat te bereiden was :

EERSTE PREPARAAT MANNEN-URINE

25 L. mannen-urine, hoofdzakelijk afkomstig van studenten, worden in ongeveer een week tijds in het anatomisch instituut verzameld en onder een weinig toluol bewaard. Voor het nu volgende indampingsproces onder lagen druk was noodig een groote metalen destilleerketel. Prof. Sjollema was zoo vriendelijk, mij een dergelijk apparaat geruimen tijd in gebruik te geven, voor welke bereidwilligheid ik hem op deze plaats uitdrukkelijk dank.

De urine wordt dan ingedampt tot ongeveer 300 cc., het is dan een dikstrooperige massa, die vervolgens met 3 L. benzol wordt gemengd. Dit mengsel blijft een dag staan, terwijl eenige malen per dag krachtig wordt geschud. Reeds korten tijd na het schudden ontmengen de beide vloeistoffen zich echter, zoodat de benzol, die de bovenlaag vormt, den volgenden dag gemakkelijk is af te zuigen. Deze benzol, lichtgeel van kleur, wordt drooggedampt, het residu in ether op genomen, met olie gemengd en de ether weer verdreven. Met dit apparaat worden de volgende proefdieren ingespoten :

(1) Trendelenburg. * Die Hormone, 1929 p. 66.

Muis N^r 34 krijgt in 6 dagen 10 injecties, totaal 1,2 cc. Bij sectie zien wij dat de glandulae slechts heel weinig groter zijn dan van een castraat, zoodat de reactie twijfelachtig is.

Muis N^r 35 krijgt dezelfde hoeveelheid, en ook hier is de reactie dubieus.

Muis N^r 36 krijgt 1,4 cc. in 7 dagen. De reactie is negatief.

Muis N^r 37 krijgt 0,9 cc. in 5 dagen. Ook hier een absolute negatieve reactie.

Waarschijnlijk is de urine te ver ingedampt, waardoor de extractie met benzol niet voldoende heeft plaats gehad, immers de benzol bleef er boven staan, de ingedampte massa zag donkerbruin en was honingachtig dik van consistentie. Een tweede proef was dus noodig :

TWEEDE PREPARAAT MANNEN-URINE.

21 L. mannen-urine (van studenten) worden zwakzuur gemaakt en ingedampt tot iets minder dan 1 L. en is dan nog goed vloeibaar. Er wordt 3 L. benzol bij gedaan en vele malen krachtig geschud. Overigens wordt het een dag met rust gelaten. Den volgenden dag wordt de benzollaag tot bijna droog gedampt, opgenomen in hexaan, geschud met 10 % NaOH, waarna de hexaan wordt verdampt en vervolgens het gebruikelijke preparaat met ol. olivarium bereid wordt. Hiermee worden ingespoten de volgende proefdieren :

Muis N^r 42 krijgt 1,5 cc. in 8 dagen, in 15 injecties. De zaadblazen hebben hier duidelijk gereageerd, niet heel sterk, maar toch niet twijfelachtig.

Muis N^r 43 krijgt 1,9 cc. in 10 dagen, in 16 injecties. Bij sectie blijken de glandulae 0,7-0,8 c.m. lang te zijn, dus duidelijk te hebben gereageerd.

Muis N^o 44 krijgt 0,8 cc. in 4 dagen (7 injecties) en vertoont geringe reactie.

Muis N^o 45 is controle. Bij sectie is slechts een speldeknoop-groot knobbeltje te vinden, dat de zaadblaas aanduidt.

Niettegenstaande de proefdieren oude castraten waren (alle waren bijna drie maanden geleden gecastreerd) is er duidelijke vergroting opgetreden. Opgemerkt moet worden, dat bij het wel geslaagde tweede preparaat tijdens de bereiding een behandeling met loog heeft plaats gehad, bij de eerste mislukte extractie niet.

Zoodra ik de beschikking kreeg over een beer, heb ik getracht, een hormoon-preparaat van de urine te maken :

EERSTE PREPARAAT URINE BEER.

De urine werd verzameld in een ijzeren bakje in de cementen vloer van het hok en steeds zuur gehouden met een weinig azijnzuur. De 9 L., die verkregen werden, zien troebel, en worden pas helder na een zuigfiltratie door papierpap. Het indampen geschiedt aanvankelijk met moeilijkheden; er is blijkbaar ergens een lek, want bij een waterbad-temperatuur van 80° C. is er nog slechts geringe destillatie. Het lek wordt gevonden in den looden afvoerbuis vlak boven den koeler, en wel door middel van gas-inblazen. Na reparatie treedt goede destillatie op bij een waterbadtemperatuur van 55° C. en nog lager. Er wordt ingedampt tot driekwart liter; deze worden met 3 L. benzol in een scheitrechter geschud. Op de grens der vloeistoffen is een lichtbruine laag te zien, die na centrifuge nog benzol blijkt te bevatten. De benzol wordt drooggedampt in een glazenkolf van 2 L. inhoud, de destillatie heeft plaats bij een temperatuur van 30-25° C. De tegen het glas gekleefde achtergebleven bruine massa wordt met ether en olie op de bekende manier behandeld en levert een bruin oliepreparaat. Hiermee worden de volgende dieren ingespoten :

Muis N° 52 krijgt 0,8 cc. in 8 dagen. Den zesden dag sterft de muis ; de sectie wijst een fibrineuze peritonitis als doodsoorzaak aan. De glandulae zijn niet vergroot.

Muis N° 53 krijgt 1,3 cc. in 10 dagen. Bij sectie vinden we een uitgebreide ontsteking onder de huid, met nekrose. Ook in de spieren. De darmen en andere ingewanden zijn veelvuldig met elkaar verkleefd, ook met de glandulae en de blaas. Een glandula is vergroot, de epitheelhoogte is hier 14,80 μ .

Muis N° 54 is de controle, De glandulae zijn moeilijk terug te vinden.

Muis N° 59 krijgt 1,2 cc. in 8 dagen. De blaasjes zijn flink vergroot, bijna zoo groot als normaal. De epitheelhoogte is 14,58 μ .

Muis N° 60 krijgt 1,4 cc. in 9 dagen. Ook hier is goede reactie der zaadblazen, en het epitheel is 16,02 μ hoog.

In verband met de ontstekingsverschijnselen dient opgemerkt, dat bij de laatste twee dieren het preparaat niet werd geschud voor de inspuiting, zoodat de toxische werking mogelijk is toe te schrijven aan de onzuiverheden, die na lang staan als een donkerbruine massa op den bodem van het fleschje zijn te vinden. Verder dient hierbij opgemerkt, dat bij deze proef geen loog werd gebruikt bij de extractie en toch een werkzaam preparaat werd verkregen.

VROUWELIJK HORMOON

Het aantonen resp. scheiden van beide hormonen maakt het nu noodig, ook het vrouwelijk te leeren kennen. Bij de theoretische bespreking heb ik reeds gebruik gemaakt van mijn bevindingen bij mijn proeven, die aanvingen met het voorbereiden van een aantal geslachtsrijpe muizen voor de proef. Daartoe moest eerst het normale beeld van den oestrus-cyclus nauwkeurig gekend worden. Dagelijks wordt een tiental muizen des morgens en des avonds een weinig vaginaalsecretum afgenomen met behulp van een klein model sonde, waarvan het knopje plat geslepen wordt, en natuurlijk moet de rand ervan niet scherp zijn, teneinde verwonding der vagina te voorkomen. Gemakkelijk kan één persoon, de staart van de muis tusschen derden en vierden vinger houdende, en het voorwerpglasje tusschen duim en wijsvinger, een behoorlijk aantal muizen in vrij korten tijd behandelen, maar niet altijd is er direct eenig secretum uit te halen. Soms lukt dat heelemaal niet, omdat er geen vaginaalsecretum aanwezig is. De voorwerpglasjes zijn vooraf in vakjes verdeeld en genummerd. Na iedere uitstrijk wordt de sonde uitgegloeid in een spiritusvlam, en gekoeld in een bakje met 70% alcohol. De voorwerpglazen worden met haemaluin en eosine gekleurd; in het algemeen geeft een korte alcohol-fixatie beter beelden dan kleuren na enkel drogen. Voor een positieve reactie werd steeds vereischt de aanwezigheid van enkel schollen, dus geen leukocyten en geen epitheelcellen. De normale cyclus is in het hoofdstuk der geslachtshormonen reeds besproken. Mikroskopisch vallen in den dioestrus op het zeer groote aantal leukocyten in den vaginaalwand en in den uteruswand. In de muscularis van de vagina in den dioestrus zien we tusschen de gladde spiercellen een zeer groot aantal ringvormige kernen van leukocyten. Bij nauwkeurig onderzoek blijkt, dat sommige van die ringen gesloten zijn.

De volgende stap was die der castratie van vrouwelijke dieren.

A. Castraties.

Eerst werden hiervoor genomen de gecontroleerde, later de gezonde vrouwelijke geslachtsrijpe muizen (dus zonder voorafgaand onderzoek op een normalen oestrus.)

De castratie verloopt (niet beloopt), evenals bij het mannelijke dier, na eenige oefening zonder moeilijkheden.

De muis wordt in linker zijligging vastgebonden en rechts boven in de flank wordt een klein sneedje of knipje in de huid gemaakt, nadat men de haren heeft weggeknipt. Vervolgens wordt de buikwand gekliefd, Voor we verder gaan wordt een draad door de wondranden van de buikspier gehaald, echter zonder aan te halen. Dan wordt het ovarium opgezocht, met een gereed liggende ligatuur afgebonden (een knoop is voldoende) en ten slotte wordt de buikwand en de huid gehecht. Links is het ovarium makkelijker te vinden, want de milt is hier een goede orientatie. Trekt men teveel aan het eerste ovarium, dan is het tweede soms wat verschoven en dus moeilijker te vinden. In het algemeen geldt: men vindt het ovarium direct en zonder moeite, maar als men moet gaan zoeken, dan ontmoet men moeilijkheden.

Met inbegrip van ethernarkose is ook deze operatie geheel alleen te verrichten, zooals ik trouwens bijna steeds zonder hulp heb gewerkt. Alleen: veel ligaturen moeten van te voren klaargemaakt worden. Zonder afbinden treedt niet zelden verbloeding op.

Heeft men een voldoende hoeveelheid dieren gecastreerd, dan vangt een tijdroovende, echter strikt noodzakelijke controle aan. Namelijk om zeker te zijn, dat beide ovaria volledig zijn verwijderd, moet eenige weken lang het vaginaalsecreet onderzocht worden om te zien of de oestrus voorgoed wegblijft. Ook wanneer men zeker denkt te zijn, dat de operatie goed is uitgevoerd, blijkt er nog wel eens een exemplaar tusschen te zijn dat oestrus vertoont. Merkwwaardiger wijze moet haast bij elke groep om deze reden een dier verwijderd worden. Over het aantal weken dat gecontroleerd moet worden, kan men van meening verschillen. De juiste duur lijkt mij te zijn vier weken, waarin eenmaal per dag of om den anderen dag

wordt uitgestreken. In gevallen van ook maar geringen twijfel moet het verdachte dier onmiddellijk verwijderd worden.

Begonnen werd met de eenvoudigste hormoonbron, waaraan het vrouwelijk geslachtshormoon een van zijn eerste namen te danken heeft: de eifollikels van het ovarium. Van op het Utrechtsche slachthuis betrokken versche runderovaria worden follikels van verschillende grootten met een schaar geopend en het afvloeiend vocht in een schaalteje opgevangen. Ook kan men met een spuitje de vloeistof opzuigen. Na filtratie wordt de nog troebele vloeistof ingespoten. Het resultaat van enkele inspuitingen ziet men hieronder:

Muis	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
I.	1	1	1-1	1-1		+	+	-	-	-	-	-
II.	2	2	2-2	2-2	+	+	+					
III.	3	3	3-3	3-3	+	+	+	-	-	-	-	-

De cijfers voor de hoeveelheden der inspuitingen geven tienden van een cc. aan. Bijvoorbeeld: op datum 6 krijgt muis Nr. 1 twee maal 0,1 cc., muis Nr. 2 tweemaal 0,2 cc., enz.

Tot 6 October vertoont geen der uitstrijkjes iets wat op oestrus gelijkt.

6 October: 's morgens. Muis N^o 1 enkele slijmdraden, geen cellen. Muis N^o 2 en 3 schollen en kernhoudende epitheelcellen.

6 October: 's avonds. Muis N^o 1 weinig kernhoudende epitheelcellen. Muis N^o 2 schollen en kernhoudende epitheelcellen. Muis N^o 3 iets meer schollen dan kernhoudende epitheelcellen.

7 October 's morgens. N^o 1: schollen + epitheelcellen aa.
N^o 2: bijna enkel schollen, slechts enkele epitheelcellen.
N^o 3: enkel schollen.

- 8 October. N° 1 en 3 enkel schollen.
 N° 2 : ook enkel schollen, maar deze muis sterft aan een longlijden.
- 9 October. Beide zijn flink positief.
- 10 October. N° 1 schollen en leukocyten.
 N° 3 schollen en veel leukocyten.
- 11 October N° 1 bijna geen secretum.
 N° 3 schollen en veel leukocyten.
- 12 October N° 1 veel epitheelcellen en veel leukocyten.
 N° 3 veel epitheelcellen en veel leukocyten.
- 14 October N° 1 en 3 weinig epitheelcellen en weinig leukocyten

Den vierden dag na de eerste inspuiting reageeren dus twee van de drie muizen positief, de derde reageert iets later.

Vervolgens wordt een hoeveelheid liquor folliculi met alcohol uitgetrokken. Na verdamping der alcohol wordt het residu flink en langdurig met water geschud, en dit waterig extract is ook werkzaam :

Bereiding : 70 cc. liquor folliculi uit runderovaria worden gemengd met 0,5 L. 96 % alcohol, en het neerslag nog eens met alcohol gewasschen. De alcohol wordt verdampt (bij 25-30° C.) en het residu met 10 cc. water geschud. Na centrifugatie blijft het preparaat troebel.

Hiermee worden drie muizen ingespoten :

	7	8	9	10	11	12	13
I.	1	1-1	—	—	+	+	—
II.	2	2-2	—	—	+	+	—
III.	3	3-3	—	—	+	+	—

Het vaginaalsecretum van N° 1 ziet er uit als volgt :

- Oct. 8 : epitheelcellen, leukocyten, slijm.
- Oct. 9 : weinig epitheelcellen, veel leukocyten, weinig slijm.
- Oct. 10 : epitheelcellen en schollen ana, geen leukocyten.
- Oct. 11 : enkel schollen.
- Oct. 12 : enkel schollen.
- Oct. 13 : schollen en leukocyten.

Het vaginaalsecretum van N° II :

- Oct. 8 : weinig epitheelcellen ; leukocyten, weinig slijm.
- Oct. 9 : zeer weinig epitheelcellen, geen leukocyten, zeer weinig slijm.
- Oct. 10 : epitheelcellen en schollen ana, geen leukocyten.
- Oct. 11 : enkel schollen.
- Oct. 12 : enkel schollen.
- Oct. 13 : schollen en leukocyten.

Het vaginaalsecretum van N° III :

- Oct. 8 : weinig epitheelcellen, weinig slijm.
- Oct. 9 : zeer weinig cellen, geen leukocyten.
- Oct. 10 : epitheelcellen en schollen ana.
- Oct. 11 : enkel schollen.
- Oct. 12 : enkel schollen.
- Oct. 13 : schollen en leukocyten.

Den vierden dag begint dus de verandering te komen, dat is na 72 uur, en na 96 uur zijn er enkel schollen. Alle drie reacties duren twee dagen.

De overgebleven ovaria, na verwijdering der liquor folliculi, onderzoeken we thans nog om te weten te komen of zij nog hormoon bevatten. Daartoe worden zij gemalen (ongeveer 300 gr.) én dan met 4 L. alcohol geextraheerd. De alcohol wordt drooggedampt, het residu in aceton opgenomen en de kolfflesch met aceton een

nacht in een mengsel van ijs en zout geplaatst. Het blijkt, dat er weinig lecithine in is. Na verwijdering der aceton door droogdam-ping wordt het residu met water opgelost, en dit preparaat blijkt nog werkzaam te zijn. Het hormoon, dat er in zit, moet afkomstig zijn van de follikelvloeistof die op de ovaria is terecht gekomen en voor het overige nog deel uitmaakt van de vochtige follikelwand. De corpora lutea bevatten, zooals anderen hebben aangetoond, althans bij de huisdieren, geen thelykinine, wel bij de vrouw.

Om na te gaan of het follikelhormoon werkzaam is ten opzich-te van de zaadblaasjes bij den gecastreerden mannelijken muis, wordt de volgende proef genomen :

45 cc. liquor folliculi uit runderovaria worden geextraheerd met 2 L. alcohol. De alcohol wordt drooggedampt, en het residu in water op-genomen : 50 cc. Dit preparaat wordt bij 3 gecasteerde mannetjes muizen ingespoten :

Muis N° 74 krijgt in 7 dagen totaal 1,9 cc.

Muis N° 75 krijgt in 17 dagen totaal 8,4 cc.

Muis N° 76 krijgt in 17 dagen totaal 8,4 cc.

N 74° heeft gehad ongeveer 6 M. E. folliculine. Er is geen ver-grooting der glandulae waar te nemen.

N° 75 heeft gehad 25 à 30 M. E. Bij sectie is geen reactie te zien.

N° 76 heeft gehad 25 à 30 M. E. Ook hier is de reactie nega-tief. Deze hoeveelheden thelykinine zijn dus onwerkzaam bij de cytologische regenerations-Test.

Verder wordt een onderzoek ingesteld naar het gehalte aan hormoon van de liquor folliculi. Daarbij blijkt, dat inspuitingen van 0,2 cc. liquor folliculi op twee achtereen volgende dagen regelmatig bronst geeft, terwijl $2 \times 0,1$ cc. meestal niet tot een volkomen schol-len stadium leiden, hoewel eenige werking niet valt te ontkennen. Dus 0,2 cc. is het minimum dat bronst geeft, en per cc. liquor folli-culi van het rund zijn er dus hoogstens 5 M. E., volgens de eisch van enkele schollen 3-4 M. E. per cc. (Laqueur geeft op 30 M. E.

per cc., hij neemt niet uitsluitend schollen als criterium voor positieve reactie). Deze getallen gelden voor de grootere follikels. VAN DER KAAIJ toonde aan dat de kysteuze follikels (1 geval van nymphomanie) zeer verschillend gehalte aan hormoon kunnen hebben: bij een nymphomane koe was het gehalte en ook de totale hoeveelheid eenige malen grooter dan normaal, terwijl ovariumkysten bij een niet nymphomane teef weinig of geen hormoon bevatten. (1) Zooals we later zullen zien, vond ik zelf in de liquor folliculi van een ovariotestis geen of zeer weinig vrouwelijk hormoon.

(1) T. v. Diergencesk. 1 Febr. 1932.

C. Scheiding der hormonen in normale urine.

Vervolgens wordt een poging gedaan om uit de urine van een beer de beide hormonen te scheiden. Hiervoor wordt de methode toegepast die Laqueur *cs.* aangeven in de *Bioch. Zeitung* deel 231 P. 1 (1930). Zij gaan daarbij uit van het feit, dat andokrinine meer bazische eigenschappen, thelykinine daarentegen meer zure eigenschappen bezit. Ook de later door Wadehn (*Endokrinologie* 12, 4, 1933) aangegeven methode ter scheiding van mannelijk en vrouwelijk hormoon berust op de zure eigenschappen van het thelykinine. Volgens MARRIAN is de zure natuur van het thelykinine te wijten aan het bezit van een zure OH-groep, zooals bij fenol. Bij androkinine zou de OH-groep een alcoholisch karakter hebben. Hun bereidingswijze uit menschen-urine geven ze aldus weer: « 100 cc. eingeëngter benzolischer Extrakt aus 50 L. Männerharn mit einem Trockengehalt von 90 m.g. per L., wird mit 50 cc. Alkohol gemischt, und hierzu 3 g. NaOH, gelöst in wenig Wasser, hinzugefügt; durch Zusatz von mehr Wasser erfolgt eine Trennung in zwei Schichten, und darauf wird der Alkoholschicht noch viermal mit je 30 cc. Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten Benzolportionen werden noch zweimal mit je 30 cc. Alkohol + 10 cc. 2 normal NaOH ausgeschüttelt und bilden dann dass Preparat U 239 Benzol, Trockengehal 30 mg. per L. Die Alkoholfraktionen werden angesäuert und viermal mit Benzol ausgeschüttelt, das erhaltene Benzol mit Soda gewaschen. Dieses Benzol trägt die Versuchsnummer U 239 Alkohol. »

U 239 Benzol bevat het mannelijk hormoon en heel weinig menformon.

U 239 Alkohol bevat geen mannelijk hormoon en bijna al het menformon.

Blijkbaar wordt hierbij verondersteld, dat het thelykinine beter

in alcohol oplost dan in benzol, terwijl androkinine dit gemakkelijker doet in benzol dan in alcohol.

Zoowel de thelykinine-fractie als de benzol-fractie zullen echter beide hormonen bevatten. Beide moeten dus zoowel bij mannelijke als bij vrouwelijke proefdieren worden ingespoten, en daarbij moet dan blijken dat de thelykinine-fractie betrekkelijk meer thelykinine bevat dan de androkinine-fractie, en minder androkinine. Een quantitative bepaling is dus noodig. Dit maakt het onderzoek omslachtig en tijdrovend.

Aangenomen, dat in de urine twee hormonen aanwezig zijn, dan zal bij een gelukte scheiding de thelykinine-fractie bijvoorbeeld a eenheden androkinine bevatten (per cc.) en th eenheden thelykinine. Het quotient heeft dan een bepaalde waarde $\frac{th}{a} = q$.

De androkinine fractie heeft dan per cc. a' eenheden androkinine (a' grooter dan a), en th' eenheden thelykinine (th' kleiner dan th), en het quotient $q' = \frac{th'}{a'}$ zal kleiner zijn. Is er èèn hormoon aanwezig dat beide reacties zou geven (een mogelijkheid, waar we bij het hermaprodiete varken aan moeten denken), dan kan de eene fractie (thelykinine fractie) bijvoorbeeld wel meer hormoon bevatten dan de andere, want zij werd op een andere manier bereid, en kan th weer grooter zijn dan th' , maar in dat geval zal ook a evenredig grooter dan a' zijn, met andere woorden: de waarden q der fracties zullen gelijk zijn. Voldoende uiteenloopende waarden q der fracties vormen dus de aanwijzing dat er twee verschillende hormonen in de urine zijn. Zooals inderdaad reeds is gebleken, bevatten de urine's van beide sexen beide hormonen, alleen gelden quantitative verschillen in dien zin, dat ieder geslacht 't meeste hormoon heeft dat zijn naam aan dit geslacht ontleent, dus een vrouwelijk dier produceert veel vrouwelijk hormoon en weinig mannelijk, een mannelijk dier omgekeerd. Direct doet zich de vraag voor: worden die twee hormonen door dezelfde cellen der gonade afgescheiden?

Ten aanzien van den testikel is het zeer waarschijnlijk dat dit inderdaad het geval is, (Bouin, Aron, Lipschütz, Steinach), name-

lijk voor de interstitieele cellen van LEYDIG. Er is weinig twijfel aan of deze cellen moeten beschouwd worden als het endokrine gedeelte der klier. Over de productieplaats der hormonen in het ovarium (van het niet bevruchte dier) zijn we voor het oogenblik nog minder georiënteerd. ZONDEK (Naturwissenschaften 20 Januari 1933) meent dat de theca cellen (theca interna) de folliculine vormen. In kysteuze follikels, waar de granulosa verdwenen is, en de theca de holte van binnen bekleedt, wordt soms ook folliculine gevorm (bij nymphomanie zelfs meer dan normaal, volgens VAN DER KAAJ (1). Hoe de toestand is bij gevallen waar theca of granulosa deelgenomen hebben aan de vorming van luteinecellen (luteinekysten), is nog niet bekend. Spelen de in de theca hier en daar nog te vinden medullaire cellen (losgeraakte cellen van de medullaire strengen) een endokrine rol? Dit is niet waarschijnlijk, maar wat weten wij ervan af?; zoo ook van de functie der primaire gonocyten? Met enkele uitzonderingen (bijnierschors, corpus luteum) is het endokrine weefsel afkomstig van het ekto- of entoderm, de genoemde uitzonderingen van mesodermaal epitheel respectievelijk mesodermaal bindweefsel; bij de gonaden zouden de hormonen afgescheiden worden uit bindweefselcellen, want de cellen van LEYDIG ontstaan vrij zeker uit het bindweefsel (bij intersexengonade zag KREDIET interstitieele cellen, die een overgang vormden van de echte typische epitheelachtige cellen van von Leydig en het bindweefsel van het interstitium.)

We gaan nu de scheiding der hormonen in de urine van een beer beproeven.

(EERSTE PROEF).

15 L. beeren urine, in vier dagen verzameld, worden gefiltreerd, maar het filtraat is niet helder te krijgen. Er wordt tot $\frac{3}{4}$ L. ingedampt en dan geëxtraheerd met 5 L. benzol. De laatste wordt ingedampt tot 140 cc., dan 70 cc. alcohol 96 % erbij gedaan en 2 g.

NaOH, opgelost in enkele cc. water; dit blijft een halven dag staan. Dan 30 cc. water toegevoegd, dat een scheiding der alcohol en benzol bewerkt. De alcohol laag wordt 3 maal met 50 cc. benzol geëxtraheerd, de vereenigde benzolporties nog 2 maal met 30 cc. alcohol + 10 cc. 2-normaal NaOH geëxtraheerd, de 2 alcohol-porties bij de 1^{ste} alcohol gedaan en goed zuur gemaakt met HCl. 12,5% De bereiding duurde zes dagen. De zure alcohol fracties worden ingedampt tot 50 cc., deze worden 3 maal geëxtraheerd met 150 cc. benzol. De benzol wordt ingedampt tot bijna droog, opgenomen in ether, dan wat NaOH toegevoegd tot neutrale reactie, 10 cc. olie met de etherische vloeistof gemengd en de ether op een waterbad verdreven. Dit preparaat zou de thelykinine moeten bevatten.

De alkalische benzolfracties worden tot zoo goed als droog ingedampt, in ether opgenomen en met een weinig HCl geneutraliseerd. Dit olie-preparaat moet de androkinine bevatten.

Injecties.

Met het *androkinine* preparaat worden 3 mannelijke en 3 vrouwelijke muizen ingespoten:

N^o 65 krijgt 1,5 cc. in 5 dagen, maar sterft.

N^o 66 krijgt 1,5 cc. in 11 dagen. Er is makroskopisch positieve reactie.

N^o 67 krijgt dezelfde doseering en vertoont ook een positieve reactie.

Bij de laatste dieren blijft veel olie onder de huid zitten. Met een spuitje is na de inspuitingen 0,8 cc. op te zuigen.

De vrouwelijke muizen krijgen in 4 dagen 0,7 cc. en reageeren den vierden dag alle positief. Kort daarna sterven er twee, de derde reageert pas na 12 dagen negatief.

Ook het *thelykinine* preparaat wordt bij 3 mannelijke en 3 vrouwelijke muizen ingespoten :

N^o 68 krijgt in 7 dagen 0,6 cc.

N^o 69 krijgt in 7 dagen 0,6 cc., er is hier goede resorptie, maar de zaadblazen zijn niet vergroot.

N^o 70 krijgt in 10 dagen 1,6 cc., ook hier is de zaadblaasreactie negatief.

Na 0,6 cc. in 3 dagen reageeren alle 3 vrouwelijke muizen positief. Na 14 dagen nog alle positief.

Uit de injecties mogen we hoogstens concludeeren, dat het androkinine preparaat sterker werkt bij de mannelijke proefdieren dan het *thelykinine* preparaat (vergelijk N^o 66 en 67 tegenover 70). Of het *thelykinine* preparaat sterker werkt in vrouwelijken zin is nog niet zeker. Dit is intusschen wel waarschijnlijk, want na de toediening van het *thelykinine* preparaat houdt de reactie veel langer aan dan na de androkinine-injecties (14 tegen 3 dagen). Verder is duidelijk gebleken, dat bij de proef veel te weinig proefdieren zijn gebruikt om conclusies te trekken ; bij de volgende proef die tot doel heeft de bereiding van waterige extracten uit de urine van den beer, is daar nog geen rekening mee gehouden :

(TWEEDE PROEF)
(WATERIGE EXTRACTEN).

10 L. urine van denzelfden beer als in de vorige proef worden ingedampt tot driekwart L. De 3 L. benzol, waarmee deze worden geëxtraheerd, worden ingedampt tot 80 cc. (bij 25 — 30° C.), waarbij nu 40 cc. alcohol 96 % plus 2 gr. NaOH, opgelost in enkele cc. water, worden gevoegd. Er wordt geschud en het mengsel blijft

18 uur staan, daarna wordt door middel van 20 cc. water de scheiding bewerkt.

De alcoholhaag wordt driemaal met 40 cc. benzol geëxtraheerd en de vereenigde benzolporties nog tweemaal met 25 cc. alcohol plus 5 cc :10% NaOH. Deze laatste alcoholporties zien iets rood. Na droogdamping van de benzol wordt 20 cc.; water bij het residu gedaan, krachtig geschud en dan een dag met rust gelaten. Den volgenden dag nog eens flink geschud en de waterige oplossing gecentrifugeerd, zij wordt echter niet helder. Dit is de androkininefractie.

De alcoholporties worden flink zuur gemaakt met zoutzuur en blijven dan eenige uren staan. Vervolgens worden ze driemaal met 200 cc. benzol geëxtraheerd, de benzol wordt verdampd en de kolf, waarin tegen den wand zich eenig residu heeft afgezet, wordt tweemaal krachtig geschud met 10 cc. aqua dest. De handeling wordt den volgenden dag herhaald. Deze 40 cc.; waterig extract zou de thelykinine bevatten.

Injecties.

Met het androkinine preparaat worden de volgende proefdieren behandeld:

- N^o 79 krijgt 0,7 cc. in 6 dagen. Reactie negatief.
 - N^o 81 krijgt 1,4 cc. in 6 dagen. Bijna geen reactie.
 - N^o 83 krijgt 2,1 cc. in 6 dagen. Reactie negatief
 - N^o 80 krijgt 1,3 cc. in 12 dagen. Zeer geringe reactie.
 - N^o 82 krijgt 2,6 cc. in 12 dagen. Zeer geringe reactie.
 - N^o 84 krijgt 3,9 cc. in 12 dagen. Geringe reactie.
- Alleen N^o 84 geeft dus iets reactie, de andere niet of dubieus. Verder krijgen 5 vrouwelijke castraten de volgende inspuitingen

DATUM

Muis n°	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
12	1	1	1-1	+	+	+	+	—	—	—
13	1	1	1-1	+	+	+	—	—	—	—
14	1	1	1-1	+	+	±	—	—	—	—
15	2	2	2-2	+	+	+	—	—	—	—
16	2	2	2-2	+	+	+	—	—	—	—

Van het *thelykinine* preparaat krijgen 4 gecastreerde mannetjes ieder 2 cc. in 10 dagen. Geen reageert positief.

5 gecastreerde vrouwtjes krijgen op dezelfde wijze het *thelykinine* toegediend als het *androkinine* (zie bovenstaande tabel). Twee die de enkele dosis ontvingen, reageeren negatief.

De uitschudding met water is blijkbaar niet effectief geweest want deze waterige oplossingen zijn veel minder werkzaam dan de olie preparaten. Het preparaat immers, dat als *androkininefractie* was bedoeld, geeft bij mannetjes enkele geringe reacties, bij de vrouwtjes reageeren alle proefdieren. Het *thelykinine* preparaat geeft bij de mannetjes geen reacties, maar bij de vrouwtjes ook enkele negatieve reacties. We concluderen dus, dat de scheiding niet gelukt is; wel is 't duidelijk te zien, dat de *androkininefractie* meer hormoon heeft dan de *thelykininefractie*, wel te verstaan van beide hormonen meer.

D. — Urine-onderzoek van het intersexueele Proefdier

EERSTE ONDERZOEK.

10 L. urine, in 5 dagen verzameld, worden met azijnzuur licht zuur gemaakt tegenover lakmoes. De indamping geschiedt totdat een donkerbruine dikke vloeistof verkregen is (driekwart liter), welke eenige malen met benzol wordt geëxtraheerd. Deze benzol, totaal 5 L., ziet lichtrood van kleur, en wordt tot 100 cc. ingedampt. Hierbij wordt eerst 50 cc. alcohol 96% gedaan, geschud, en dan 3 gr. NaOH, in enkele cc. water opgelost, toegevoegd. Er wordt nog eens flink geschud en dan blijft de vloeistof een halven dag staan. Na toevoeging van 18 cc. water volgt scheiding van benzol en alcohol.

De alcoholhaag, bruinrood van kleur, wordt viermaal met 50cc. benzol uitgetrokken, waarbij de benzol steeds lichter van kleur wordt. Deze 200 cc. benzol wordt gevoegd bij de eerste 100 cc., en de gezamenlijke hoeveelheid tweemaal uitgeschud met 30 cc. alcohol plus 10 cc. 2-normaal NaOH. Daarna wordt de benzol drooggedampt en volgt de gewone behandeling met ether en olie. Dit is de *androkinine-fractie*.

De eerste 50 cc. en de later verkregen tweemaal 30 cc. alcohol worden zuur gemaakt met zoutzuur, en dan viermaal uitgetrokken met benzol. Deze benzol wordt drooggedampt, nadat ze met soda is gewasschen en met behulp van ether en olie wordt dan deze *thelykinine fractie* tot stand gebracht.

Met de androkinine fractie worden 6 mannelijke en 5 vrouwelijke castraten ingespoten; de schemata dezer inspuitingen volgen hier.

Ook met de thelykinine-fractie worden zoowel mannelijke als vrouwelijke proefdieren behandeld.

Steeds werd zorgvuldig nagegaan, of door de insteekopening geen olie naar buiten kwam, daar dit de doseering zou vertroebelen. Het kon gemakkelijk verhinderd worden, door op de opening een druppeltje collodium aan te brengen.

ANDROKININE-FRACTIE.

Mannelijk

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	makrosk.	epitheel
1	1	1	1	1	S								geringe react.	14,76
2	1	1	1	1	S								pos. reac., secr.	15,70
3		2	1	1	1	1	1	2	1	1	S		flinke reactie	
4	1	1	1	1	1	1	S						pos. reac. secr.	15,69
5		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	S				geringe reactie	16,02
6		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	S			geringe reactie	14,40

Ieder streepje is weer 0,1 cc., en 0,1 in de tabel is dus 0,01 cc. preparaat. — S. = sectie.

Vrouwelijk

	18	19	20	21	22	23
18	1	1	—	±	+	+
19	1	1	—	—	+	+
20	1	1	1	+	+	+
21	0,1	0,1	0,1	±	+	+
17	0,1	0,1	0,1	±	+	+

CONCLUSIES.

De androkinine-fractie geeft bij mannetjes steeds positieve reactie, ook bij tienmalige verdunning met oleum olivarum. Wel zien wij in dit laatste geval weinig makroskopische reactie, maar de gevonden epitheelhoogten wijzen op activiteit. Om te komen tot een berekening der hoeveelheden moeten we de kleinste dosis kennen, die nog reactie geeft (de eenheid). We hebben dus te geringe ver-

dunningen ingespoten en zullen in de volgende bepalingen er aan denken, dat we moeten doseeren tot negatieve reactie. Het gezegde geldt ook voor de insputtingen bij de gecastreerde vrouwtjes.

THELYKININE-FRACTIE.

Mannetjes.

	18	19	20	21	22	23	24	25	27	makrosk.	epiheel
	1	1	1	S						geringe reactie	14,40
muis	1	1	1	1	S					geringe reactie	15,03
	1	1	1	1				1	S	duidelijke reactie	14,94
	1	1	1	1				1	S	duidelijke reactie	14,94

Vrouwtjes.

	18	19	20	21	22	23	24	25
	1	1	±	+	+	+	+	
	1	1	—	+	+	+	+	
	1	1	—	+	+	+	+	
muis			0,1	+	+	+	+	
			0,1	+	+	+		
a				0,1	0,1	—	±	+
b				0,1	0,1	—	+	+

De thylykinine-fractie geeft ook alleen positieve reacties. Bij de vrouwelijke proefdieren doet zich een merkwaardigheid voor. De nummers 12, 13 en 14 reageeren normaal bij insputting van tweemaal 0,1 cc., dat wil zeggen, 3 dagen na de eerste insputting, waarbij de dag der insputting niet meetelt. De reactie blijft 14 dagen aanhouden. De nummers 15 en 16 echter, die in denzelfden bak met de genoemde zaten, reageerden reeds den dag na insputting van

0,01 cc., en ook deze reactie hield 14 dagen aan. Muis a en b werden apart gezet en twee opeenvolgende dagen ingespoten met 0,01 cc. daarna bleek, dat deze dosis een normale reactie geeft op den normalen tijd, dat wil zeggen op den vierden dag en twee dagen aanhoudende. De verklaring van de positieve reactie van 15 en 16 moet dan ook gezocht worden in de aanwezigheid van de nummers 12, 13 en 14. Deze hebben blijkbaar een dosis gehad, die ver ligt boven de eenheid (14 dagen positief blijven der reactie), en met urine en faeces zullen ze zeker hormoon hebben uitgescheiden, waarvan 15 en 16 een deel hebben opgenomen, hetzij door contact met door urine bevochtigd stroo (dus door de huid), hetzij per os. Bij latere proeven heb ik opgemerkt, dat dit verschijnsel van mee-reageeren van controle-dieren uitblijft als de dosis der ingespoten dieren slechts weinig of niet boven de eenheids-dosis ligt.

Uit deze proef is weer gebleken, dat van iedere fractie een grooter aantal dieren moet worden ingespoten, teneinde de minimale werkingswaarde te leeren kennen. Dit brengt echter mee de noodzakelijkheid van een fijner onderscheidingsmethode tusschen positief en negatieve reactie. VOSS en LOEWE meenen die gevonden te hebben in het optreden van mitosen der epitheelcellen van de glandulae. Deze laatste vertoonen bij den normalen mannelijken muis zeer zelden een mitose. De gestorven cellen worden volgens VOSS en LOEWE aangevuld door het tot gewone secretorische cellen uitgroeien der zoogenaamde basale cellen, bij welk proces overgangstadia door mij niet overtuigend aangetoond konden worden (zie pag. 43). In het mikroskopisch beeld van de glandula van den gecastreerden muis, waar alle teekenen van activiteit ontbreken, vinden wij natuurlijk geen spoor van celdeeling. Na inspuiting van geslachtshormoon echter wel, en zelfs schijnt de mitose één der eerste waarneembare werkingen van het hormoon te zijn. Nog voor er, ook mikroskopisch, verhooging van het epitheel, om nog niet te spreken van secretiegranula, is waar te nemen, zien we reeds hier en daar stadia van mitosen (foto N^r 6). De vraag werpt zich op,

waarom bij het normale dier, waar toch ook hormoon wordt aan-gevoerd, de mitosen zoo zeldzaam zijn, en de vervanging van op-gebruikte cellen gebeuren zou door opgroeien der basaalcellen, ter-wijl bij de kunstmatige toediening van hormoon bij het gecasteerde dier dikwijls een groot aantal mitosen optreden. Van de basaalcel-len is bij de castratenglandula niets te bespeuren; men zou dus kunnen zeggen, dat die bron afwezig is, en de natuur hier op de celdeeling is aangewezen. In hoever mijn bevindingen over de waarde der mitosen als criterium voor een positieve reactie passen bij de andere verschijnselen, zullen de tweede en derde bepaling doen uitkomen.

TWEEDE ONDERZOEK

11 L. urine, in 5 dagen verzameld, worden door papierpap ge-filtreerd, maar niet helder verkregen. De bewaring geschiedde na lichte aanzuring tegenover lakmoes (met acid. acet. dil.), met 50 cc. toluol. Deze urine werd ingedampt tot ongeveer 800 cc. De destilla-tie gebeurde in 7 uur, waarbij de temperatuur van het waterbad ruim 50° C. was en na het langzaam dalen dezer temperatuur tot 40° C. nog in den ontvanger druppels bleven vallen. Het destilleeren begon pas als het waterbad op 65° C. was gebracht, en dan sterk; langzaam werd dan teruggedaan tot 55-50° C. en bleef het destil-laat als een straaltje vloeien. Vervolgens werd de ketel met benzol goed uitgespoeld en nog eens nabehandeld met een weinig water. De ingedampte urine, die goed vloeibaar was, wordt nu met 3 L. benzol in twee groote scheidtrechters samengebracht en flink geschud ('s morgens 9 uur), om 12 uur wordt opnieuw krachtig geschud. De benzol ziet nu rood met een iets bruine tint erin, terwijl onder de benzol zich de bruine urine-laag bevindt. Na een derde keer schud-den verdeelt zich de benzol in die bruine laag in fijne deeltjes en is als heldere bovenlaag geheel verdwenen; er is dan één bruine vloei-stof en na eenige minuten scheidt zich de benzol niet af. Ook den

volgenden dag is er nog één bruingele vloeistof, maar bij het aflopen der vloeistof uit de trechter in een bekersglas ontmengt zich plotseling de vloeistof, waarbij de benzol de kleur heeft van verdunde roode wijn. De urine wordt nogmaals op dezelfde wijze met benzol uitgetrokken en de ontmenging lukt weer op dezelfde manier. Totaal ruim 5 L. benzol, aldus verkregen, wordt in een glazen kolf tot 100 cc. ingedampt. Het waterbad heeft hierbij een temperatuur van 50° C. en het koken gebeurt bij 25-37° C., afhankelijk van de contractie.

De 100 cc. benzolisch extract wordt gemengd met 50 cc. alcohol 96 %. en dan 2 gr. NaOH, opgelost in weinig water, erbij gevoegd. Na schudden volgt enkele uren staan en dan de scheiding met behulp van 15 cc. water. De benzollaag ziet rood, de alcoholhoog donkerbruin.

De alcoholhoog wordt 3 maal met 100 cc. benzol geëxtraheerd; de alcoholhoog wordt hierbij telkens kleiner, er gaat blijkbaar wat alcohol (met water?) in de benzol over. De 100 + 3 maal 100 cc. benzol worden nog 2 maal geëxtraheerd met 30 alcohol + 5 cc. 2 normaal NaOH., de benzol bevat het androkinine. Zij wordt drooggedampt, het residu in ether en olie opgelost, en de ether verdreven op een waterbad in een porceleinen schaalte, het olie preparaat is 12 cc. (*androkininefractie*)

De eerste alcoholhoog (die minder dan 50 + 15 cc. water is geworden), plus de 2 maal 30 cc. alcohol worden nu met verdund zoutzuur zuur gemaakt tegenover lakmoes, de kleur wordt daarbij lichterbruin. Deze alcohol wordt 3 keer met 100 cc. benzol geëxtraheerd, de benzollagen zien nu niet zoo rood als bij de androkinine fractie, maar meer lichtbruin. De benzol wordt met soda gewaschen, en drooggedampt. Na behandeling met ether en olie is de thelykinine fractie, 12 cc. groot.

Hieronder volgen de tabellen voor de inspuitingen, eerst voor de androkininefractie, daarna met de thelykininefractie.

ANDROKININE-FRACTIE

Mannelijke castraten.

preparaat onverdund.

muis		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
101		1	1	1	1	1		1	S					
102		1	1	1	1	1		1	1	1		S		
103		1	1	1	1	1		1	1	1		1	1	S.

preparaat 10 × verdund.

muis														
104		1	1	1	1	1	1	1	S					
105		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S		
106		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S.

preparaat 50 × verdund.

muis		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
107		1	1	1	1	1	1	1	S							
108		1	1	1	1	1	1	1	1	1	S					
109		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S			

THELYKININE-FRACTIE.

Mannelijke castraten.

preparaat onverdund.

110		1		1		1		1		1		1		S.						
111		1		1		1		1		1		1		S.						
112		1		1		1		1		1		1		1		1		S.		
113		1		1		1		1		1		1		1		1		S.		

preparaat 10 × verdund.

114		1		1		1		1		1		S.									
115		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1	S

preparaat 50 × verdund.

116		1		1		1		1		1		S.								
117		1		1		1		1		1		1		S.						
118		1		1		1		1		1		1		1		S.				
119		controle																		
120		controle																		
121		controle																		

SECTIES EN MIKROSKOPISCH ONDERZOEK
N°101-118.

101.
Sectie : iets vergroote vesiculae, waarschijnlijk secretum, maar heel weinig.
Mikrosk. : duidelijk eosinophiel secretum, granula onduidelijk. een of twee mitosen in het preparaat. Plooien interstitieel weefsel hier en daar verbreed, meer bindweefsel dan normaal. Epitheelhoogte 15-12 μ .
102.
Sectie : geringe, maar duidelijke vergrooting. Geen secretum te zien.
Mikrosk. : vrij wat secretum, ook hier en daar granula. Slechts één mitose. De totaalindruk is duidelijk positief. Het bindweefsel is nog in grootere hoeveelheid aanwezig dan bij een normaal dier. De epitheelhoogte is 15,12 μ .
103.
Sectie : geringe vergrooting, geen secretum.
Mikrosk. : nogal wat secretum, ook granula, en hoog epitheel, geen mitosen, nog wel veel bindweefsel. De epitheelhoogte is 15,12 μ .
104.
Sectie : geen vergrooting, geen secretum.
Mikrosk. : geen secretum en geen granula, geen mitosen, laag epitheel, negatief beeld, vrij veel bindweefsel. Epitheelhoogte 11,16 μ .
105.
Sectie : twijfelachtige vergrooting.
Mikrosk. : volkomen het beeld van een castraat-vesicula. Geen mitosen. De epitheelhoogte is 11,70 μ .

106.

Sectie : geringe vergrooting ; geen secretum.

Mikrosk. : geen granula of secretum ; vrij veel mitosen. Nul, een of twee per gezichtsveld, ook wel eens drie. Vrij veel bindweefsel, laag epitheel. Epitheelhoogte 12.42 μ .

107.

Sectie : geen vergrooting der vesiculae.

Mikrosk. : als van castraat, laag vacuolair epitheel. Geen secretum. Totaal één mitose. Epitheelhoogte 12.42 μ .

108.

Sectie : geen vergrooting.

Mikrosk. : als van castraat. Zware bindweefsel fibrillen. Donker, weinig eosinofiel protoplasma. Geen mitosen. Epitheelhoogte 10.80 μ .

109.

Sectie : geen vergrooting.

Mikrosk. : als van castraat. Eén mitose. Vrij wijd lumen, geen secretie. Laag epitheel. Epitheelhoogte 11,52 μ .

110.

Sectie : geen vergrooting.

Mikrosk. : laag epitheel, veel bindweefsel, geen granula of secretum. Per coupe, enkele mitosen, soms één tot twee, ook wel drie tot vier. Behalve de mitosen het beeld nog negatief. Epitheelhoogte 12,24 μ .

111.

Sectie : geen makroskopische reactie.

Mikrosk. : laag epitheel, veel bindweefsel, geen secretum, beeld negatief, geen mitosen. In de omgeving eenig ontstekingsinfiltraat. Hoogte epitheel onzeker door gebrekkig preparaat.

112.

Sectie : geen reactie.

Mikrosk. : beeld negatief, één mitose per coupe. Epitheelhoogte 13,14 μ , het beeld is echter niet fraai, dus een waarschijnlijke fout is niet uit te sluiten.

113.

Sectie : geen reactie.

Mikrosk. : beeld negatief, geen mitose. Epitheelhoogte 14,94 μ .

114.

Sectie : geen vergrooiting.

Mikrosk. : epitheel lijkt iets hoger. Eenige mitosen, op enkele plaatsen meer dan één per gezichtsveld. Verder negatief. De epitheelhoogte is 14,04 μ .

115.

Sectie : geringe vergrooiting.

Mikrosk. : epitheel lijkt iets hoger. Een tot twee mitosen per coupe. Geen secretum. Epitheelhoogte 14,04 μ .

116.

Sectie : geen verandering. Er is vergroeiing door ontsteking.

Mikrosk. : beeld geheel negatief ; totaal één mitose. Epitheelhoogte 13,32 μ .

117.

Sectie : geen reactie.

Mikrosk. : beeld geheel negatief. Geen enkele mitose. Het epitheel is slecht te meten.

118.

Sectie : geen reactie.

Mikrosk. : negatief beeld, geen mitosen. Epitheelhoogte 11,88 μ .

Thans volgt een bespreking van de resultaten dezer injecties. Daaruit zal dan een berekening van het aantal muis-eenheden gedaan worden.

Eerst wordt de androkininefractie onderzocht op het aantal M. E. androkinine en thelykinine en het quotient van deze twee getallen vastgesteld; daarna gebeurt hetzelfde voor de thelykininefractie.

Bespreking van de resultaten der injecties en berekening van het aantal eenheden.

A. — ANDROKININE-FRACTIE

I. — *Androkinine-bepaling.*

De groep met het onverdunde preparaat ingespoten (nummers 101, 102 en 103, die resp. gehad hebben 0,6, 0,8 en 1,0 cc.) vertoont eenige, zij het geringe vergrooing der geatrophieerde glandulae; slechts bij N^o 101 is waarschijnlijk iets van secretum waar te nemen met het bloote oog, terwijl het mikroskopisch zichtbaar is door kleuring met eosine in alle drie gevallen. Zelfs zijn bij 102 en 103 de granula goed waarneembaar, hoewel niet op alle plaatsen, men moet er even naar zoeken. De epitheelhoogte toont mikroskopisch, ook voor de meting, een oogenschijnlijk grooter bedrag dan van castraten-glandulae. Ten slotte is de hoeveelheid bindweefsel veel grooter dan bij een normale glandula, en niet merkbaar minder dan bij een castraten-glandula van een niet ingespoten dier. Het epitheel blijkt bij alle drie 15,12 μ hoog te zijn, dus kenmerken van een positieve reactie zijn aanwezig, alleen de aan- of afwezigheid van mitosen komt niet volkomen overeen met de verschillende positieve verschijnselen. Neemt men de aanwezigheid van granula resp. lumensecretum als criterium voor de positieve reactie aan, dan is de

toenemende duidelijkheid der granula in de volgorde 101, 102 en 103 in overeenstemming met de stijgende hoeveelheid hormoon, bij die dieren ingespoten. We zien echter in dezelfde volgorde het aantal mitosen afnemen; bij de muis, die de grootste hoeveelheid heeft gehad zien we geen mitosen, en die de kleinste hoeveelheid kreeg, heeft minstens evenveel mitosen als de middelmatige hoeveelheid. Ook bij verder onderzoek blijkt, dat waar de positieve reacties hun onderste grens bereiken, wat epitheelhoogte betreft bijvoorbeeld, het aantal mitosen soms aanmerkelijk is, en bij zeer sterk positieve reacties met volkomen normaal epitheel en groote granula er soms geen mitosen zijn te zien. De eerst waarneembare verschijnselen der hormoonwerking schijnen dus deelings-verschijnselen te zijn, terwijl het lang duurt voordat de specifieke veranderingen in de functie (zooals vorming van granula, epitheelcelverhoogen) kenbaar worden. Is dit optreden van mitosen regelmatig, dan kan men het bij geringe positieve dubieuze gevallen tot criterium verklaren, zelfs mag men, indien men geen andere positieve verschijnselen ziet, uit de aanwezigheid van mitosen tot hormoonwerking besluiten, aldus een fijner maatstaf kiezende, en daarbij de eisch voor de eenheid lager stellende. Het spreekt vanzelf, dat men dan het aantal eenheden grootter vindt.

Bij de groep, die het preparaat $10 \times$ verdund ingespoten kreeg, is bij de laagste dosis makroskopisch geen vergrooting te zien, bij de middelmatige dosis dubieus, bij de hoogste dosis gering. Ook de epitheelhoogte is in denzelfde zin stijgende: 11,16, -11,70, -12,42. De laatste waarde is opzichzelf dubieus voor een positieve reactie, typisch is echter dat alleen bij deze derde der groep vrij veel mitosen optreden, bij de andere twee géén. We moeten dus besluiten dat 106 positief is, 105 en 104 negatief.

De derde groep (50maal verdund preparaat) vertoont eenige onregelmatigheden. Makroskopisch is geen reactie te zien, mikroskopisch zien we vrijwel het beeld negatief, namelijk laag, vacuolair protoplasma, gering eosinophiel, geen spoor van secretum. De epi-

theelhoogten in stijgende dosis zijn respectievelijk : 12,42 - 10.80 - 11,52, dus dit is zeer onregelmatig. Bij de hoogste en de laagste dosis zien we één mitose in het geheel, bij de middelmatige dosis géén. Van de laagste dosis is de epitheelhoogte dubieus voor een positieve reactie, de enkele mitose wijst er ook op dat dit een dubieus geval is, maar in verband met de negatieve reactie van 104 en 105 rekenen we alle drie negatief. 1 cc. (10 tienden) van het tien maal verdund preparaat is dus positief, oftewel 1/10 cc. van het oorspronkelijke preparaat, de androkinine fractie van 12 cc. ; in welke 12 cc. dus 12 gedeeld door 0,1 is 120 E. zitten. Daar deze fractie afkomstig is uit 11 L. urine, is er per L. urine 120 gedeeld door elf is ongeveer 11 M.E. androkinine.

II. — Wat betreft de *thelykine bepaling* der androkinine fractie het volgende : het onverdunde preparaat geeft na vier dagen sterk positieve reactie, die bovendien ongeveer tien dagen aanhoudt. Er is geen sprake van iets anders dan schollen in het preparaat. In de zelfde bak zijn twee controle's, dus niet ingespoten dieren. Deze hebben op gelijke wijze maar korter gereageerd, en dit kan verklaard worden door opklikken van op de huid geperst materiaal bij de inspuiting of door opnemen van urine der ingespoten dieren, in beide gevallen dus reacties per os. Ook de 10 maal en 50 maal verdunning geven, wanneer 3 keer 0,1 cc. op 3 dagen wordt ingespoten, den derden of vierden dag reactie, die nu aanmerkelijk korter duurt, respectievelijk 6 en 2-3 dagen.

Bij de derde groep reageert de controle nu niet meer. 3 maal 0,1 cc. der verdunning 50 geeft dus nog geen positieve reactie, bij 2 maal 0,1 geeft van twee muizen nog één de reactie. Van drie muizen, die 2 maal 0,1 cc. verdunning 100 krijgen, reageren twee negatief, één dubieus, dat wil zeggen er zijn wel schollen, maar nog vele kernhoudende epitheelcellen daarbij, dus eigenlijk negatief. 2 keer 0,1 cc. verdunning 200 en 1000 zijn volkomen werkloos in oestrogeen opzicht. Conclusie : 2 tot 3 maal 0,1 cc. van ver-

dunning 50 is positief, dit is 2 gedeeld door 500 van het onverdunde preparaat.

In 12 cc. zijn 12 gedeeld door $\frac{2}{5000}$ is 3000 E., dus per L. urine 3000 gedeeld door 11 is ongeveer 270 E.

Bij 3/10 cc. krijgen we 180 E. per L., gemiddeld dus $(270 + 180)$ gedeeld door 2 = 225 E.

Van de androkinine-fractie is Q dus 225 gedeeld door 11 = 20,5.

B. — THELYKININE-FRACTIE.

I. — Androkinine-bepaling

Hier dekken de makroskopische bevindingen de mikroskopische niet zoo goed als bij de androkinine fractie. We vinden bij de sectie namelijk geen vergrooting, terwijl we op mikroskopische gronden toch positieve reacties moeten aannemen, zelfs meer dan bij de androkinine fractie, hetgeen onlogisch is, en doet vermoeden dat de scheiding der hormonen niet gelukt is.

Van 110 en 112 is de epitheelhoogte op de grens, namelijk 12,24 en 13,14, de mitosen echter veroorloven van een positieve reactie te spreken. 111 is onzeker; 113 is positief (14,94). De twee muizen met 10 keer verdund preparaat ingespoten, zijn voor het epitheel positief 14,04 en 14,04, bij de laatste zien we meerdere mitosen. Van 116 en 118 is de hoogte respectievelijk: 13,32 en 11,88; bij 116 is slechts één mitose in het geheel te zien en dit rekenen we dan ook een negatieve reactie, vooral ook omdat 118, die meer kreeg, duidelijk negatief is. De reactie van No 117 is onzeker.

Het blijkt dus, dat 0,5 cc. van het 10 × verdund preparaat nog een positieve reactie geeft. In de 12 cc. preparaat zijn dus 12 gedeeld door een twintigste, is gelijk 240 eenheden, en per Liter 240 gedeeld door 11, is gelijk 22 eenheden.

II. — *Thelykinine-bepaling.*

De met onverdund, $10 \times$ verdund en met $50 \times$ verdund preparaat ingespoten dieren reageeren alle positief. De reactie blijft positief gedurende enkele weken bij de eerste groep (onverdund preparaat), bij $10 \times$ verdund ongeveer een week en bij de 50-malige verdunning 3 dagen.

Twee van de drie dieren, die $2 \times 0,1$ cc. van de verdunning 200 hebben gehad, reageerden positief, de derde twijfelachtig, dwz. wel schollen, maar ook nog kernhoudende epitheelcellen. Met de verdunning 500 en 1000 is alles negatief. Ook een controle, met ol. olivarium ingespoten, blijft negatief. 0,2 cc. van verdunning 200 is dus positief. In 12 cc. preparaat zitten dus 12 gedeeld door $\frac{0,2}{200}$ is 12000 E. Per L. urine dus 12000 gedeeld door 11 is 1090 E. thelykinine.

Van de thelykinine fractie heeft Q dus een waarde van 1090 gedeeld door 22 is ongeveer 50.

De totale hoeveelheid thelykinine E. in de urine is $225 + 1090 = 1315$ E.

De totale hoeveelheid androkinine E. in de urine is $11 + 22 = 33$ E.

Ook deze bepaling staat niet toe, een conclusie te trekken over de vraag die we ons gesteld hebben. Wel zien we dat de waarde Q der thelykinine fractie 2,5 maal zoo groot is als die der androkinine fractie. We zouden echter verwachten dat dit tot stand zou komen zoowel door een hooger aantal thelykinine E. bij de thelykinine fractie, als door een lager aantal androkinine E. bij deze fractie. 't Eerste blijkt wel het geval te zijn en wel ongeveer 5 maal meer. Deze verhoudingen zijn wel betrouwbaar, want de grens tusschen positief en negatief is door de uitstrijkmethode vrij nauwkeurig te bepalen. Dit is echter in mindere mate het geval bij de reactie der zaadblazen; hier dekken de aanwijzingen voor positief of negatief, verkregen uit verschillende gegevens (epitheelhoogte, mitosen, makroskopische

reactie), elkaar niet steeds, en alleen een volkomen parallel loop der criteria geeft zekerheid om in ons geval, waar we voor het aantal androkinine E. der androkinine fractie en thelykinine fractie respectievelijk vinden 11 en 22, aan die cijfers onbetwistbare waarde toe te kennen. We hebben gevonden: in de thelykinine fractie zit 5 keer zooveel thelykinine E. als in de androkinine fractie, en 2 keer zooveel androkinine E. Theoretisch is dit bij aanwezigheid van één hormoon onmogelijk, tenzij men de volkomen ongegronde hypothese stelt, dat in de verschillende fracties de werkingswaarde in mannelijk of vrouwelijk opzicht verschillend kan zijn. Er blijkt dus wel, dat de thelykinine fractie meer hormoon bevat. Toch is de waarde 2 keer zooveel androkinine mijns inziens niet voldoende om hierin het bewijs te zien van de aanwezigheid van 2 hormonen, hoogstens een aanwijzing. Daarom wordt overgegaan tot een derde bepaling.

DERDE ONDERZOEK

Bereiding.

13 L. zwak zure urine, in 6 dagen verzameld, worden ingedampd tot 1,5 L. Het overdestilleeren begint bij een waterbad temperatuur van 70° C., deze zakt dan langzamerhand tot 55-50° C., terwijl de destillatie doorgaat; de duur daarvan bedraagt 8 uur. De overblijvende vloeistof is zwartbruin van kleur, goed vloeibaar, zelfs waterachtig, en geeft een sterk doordringenden, onaangename geur af. De 1,5 L. worden eenige malen uitgetrokken met benzol, waarvoor totaal 3,5 L. worden gebruikt. Deze benzol ziet oranjebruin en iets naar rood, maar niet zoo rood als bij de vorige keeren. Zij is moeilijk van de urine te scheiden; er is dan ook enkele malen krachtig geschud. Nadat de vloeistof een dag heeft gestaan, gelukt de scheiding door vele malen kleine hoeveelheden af te laten loopen, en dan weer te wachten tot er iets benzol vrijkomt. Zodoende is er 3 L. benzol te verzamelen, de rest blijft in de lichte, schuimachtige vloeistof achter. Er wordt niet gecentrifugeerd om deze rest nog te achterhalen, want het is geen quantitative bepaling. In een glazen kolf van 2 L. inhoud, en omgeven door een metalen vlechtwerk ter beveiliging, wordt de benzol bij een temperatuur van 30-35° C. ingedampd tot 50 cc., die donker-zwart-bruin van kleur zijn. Er wordt bijgevoegd 50 cc. alcohol 96 % en 4 cc. water waarin opgelost 1 gr. NaOH. Dan wordt geschud en den volgenden morgen de scheiding bewerkt door middel van 8cc. water. *De benzollaag wordt weggedaan.* De alcoholaag wordt vier maal met 50 cc. benzol geëxtraheerd; bij de scheidingen wordt de hoeveelheid telkens kleiner. De 200 cc. benzol, roze-rood van kleur, worden tweemaal geëxtraheerd met 30 cc. alcohol + 5 cc. 2,5 normaal NaOH, vervolgens drooggedampd, het residu in ether opgenomen, met olie vermengd en de ether weer verdreven. Dan blijft over 10 cc. oleum olivarum, waarin opgelost de androkinine.

De eerste alcoholhaag (minder dan 50 cc. geworden) en de tweemaal 30 cc. alcohol worden bij elkaar gevoegd en flink zuur gemaakt met HCl, waarbij de kleur veel lichter wordt. Na een uur wordt de alc. met benzol geëxtraheerd (tweemaal met 150 cc.), de benzolische oplossing met soda gewasschen en de benzol drooggedampt. Met behulp van ether en olie wordt het thelykinine-preparaat verkregen: 10 cc. De twee fracties worden bij muizen ingespoten volgens de onderstaande tabellen.

ANDROKININE-FRACTIE

Mannetjes.

preparaat onverdund.

	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6
119	1	1	1	1	1	S.					
120	1	1	1	1	1	1	S.				
121	1	1	1	1	1	1	1	1S			

preparaat 10 × verdund.

122	1	1	1	1	1	S.					mislukt
123	1	1	1	1	1	1	S.				
124	1	1	1	1	1	1	1	1S			
125	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S.	

preparaat 50 × verdund.

126		1	1	1	1	1	1	1	1	S.	
127		1	1	1	1	1	1	1	1	S.	

Vrouwtjes.

preparaat 10 × verdund.

1	1	1	—	—	—	—					
2	1	1	—	—	+	—					
3	1	1	—	—	±	—					
4	1	1	—	—	—	—					

preparaat 50 × verdund.

5		1	—	1	—	—	—	—	—					
6		1	—	1	—	—	—	—	—					
7		1	—	1	—	—	—	—	—					
8		1	—	1	—	—	—	—	—					

THELYKININE-FRACTIE.

Mannetjes.

preparaat onverdund.

		26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6		
128		1	1	1	1	1	S.							
129		1	1	1	1	1	1	S.						
130		1	1	1	1	1	1	1	S.					

preparaat 10 × verdund.

131		1	1	1	1	1	S.							
132		1	1	1	1	1	1	S.						
133		1	1	1	1	1	1	1	S.					
134		1	1	1	1	1	1	1	1	1	S.			
135		controle												

preparaat 50 × verdund.

136			1	1	1	1	1	1	1	1	S.			
137			1	1	1	1	1	1	1	1	S.			

Vrouwtjes.

preparaat 100 × verdund.

1		1	1		—	+	—							
2		1	1		—	±	—							
3		1	1		—	+	—							

preparaat 500 × verdund.

1		1	1		—	+	—							
2		1	1		—	±	—							
3		1	1		—	+	—							
4		1	1	—	—	—	—	—						
5		1	1	—	—	±	+	—						

preparaat 1000 × verdund.

1		1	1	—	—	—	—	—						
2		1	1	—	—	—	—	—						

SECTIE VAN N° 119-136.

- 119 : geringe vergrooting der blaasjes, melkachtig van kleur.
 120 : geringe vergrooting der blaasjes, secretum dubieus.
 121 : dubieuze reactie der zaadblazen.
 122 : geen reactie der zaadblazen.
 123 : dubieuze reactie.
 124 : » »
 125 : » »
 126 : » »
 127 : » »
 128 : geringe vergrooting der blazen, geen secretum.
 129 : geringe vergrooting.
 130 : dubieuze reactie.
 131 : Grooter dan gewoonlijk, maar volkomen plat en leeg.
 132 : geen reactie
 133 : dubieuze reactie.
 134 : dubieuze reactie.
 136 : dubieuze reactie.
 137 : dubieuze reactie.

Mikroskopisch onderzoek van N° 119-136.

- 119 : 1-2 niet duidelijke mitosen per coupe. De indruk is negatief.
 120 : eenige mitosen per gezichtsveld, soms 4-5. Verder negatief.
 121 : een enkele onduidelijke mitose.
 122 :
 123 : geen mitosen.
 124 : geen mitosen.
 125 : 2 mitosen per coupe.
 126 : geen mitosen.

127 : eenige mitosen per gezichtsveld.

128 : 3-4 mitosen per coupe.

129 : geen mitosen. Ontsteking.

130 : geen mitosen.

131 : geen mitosen.

132 : een tiental mitosen per coupe.

133 : geen mitosen.

134 : geen mitosen.

136 : geen mitosen. Ontsteking.

137 : geen mitosen.

Controle : geen mitosen.

Berekening van het aantal eenheden.

Androkinine-fractie.

Vrouwtjes. Van de 4 muizen, die tweemaal 0,1 cc., van het tienmaal verdunde preparaat hebben gehad, reageert een positief een dubieus en twee negatief. We rekenen dus $2 \times 0,1$ cc. van de verdunning 10 positief, hoewel het aan de grens is. 0,02 cc. van het stam-preparaat is dus positief, en in die 10 cc. stam-preparaat zijn : 10 gedeeld door 0,02 = 500 M.E. Per liter wordt dat : 500 gedeeld door 13 = 39 M. E. thelykinine.

Mannetjes. Een van de twee muizen, die $8 \times 0,1$ cc. van het vijftig maal verdunde preparaat hebben gehad, vertoont meerdere mitosen, namelijk N° 127, dit is dus positief.

In het stam-preparaat zijn 10, gedeeld door 0,016 = 625 M.E., en per liter urine : 48 M.E.

Thelykinine-fractie.

Vrouwtjes. 0,2 cc. van de verdunning 500 is positief. In 10 cc. preparaat zijn $10 : 0,0004 = 25000$ M.E., en per liter urine : $25000 : 13 = 1924$ M.E.

Mannetjes. $6 \times 0,1$ cc. van de verdunning 10 is positief (N° 132) ; in 10 cc. preparaat zijn dan $10 : 0,06 = 167$ eenheden en per liter urine : $167 : 13 = 13$ M.E.

Van de androkinine-fractie is $\frac{th}{a} = 39 : 48 = 0,81$.

Van de thylykinine-fractie is $\frac{th}{a} = 1924 : 13 = 148$.

De totale hoeveelheid thylykinine eenheden per liter urine is
 $39 + 1924 = 1963$ M.E.

De totale hoeveelheid androkinine eenheden per liter urine is
 $48 + 13 = 61$ M.E.

BESPREKING DER RESULTATEN.

Noemen we de eerste benzolfractie, dus die, welke we bij de derde bepaling hebben weggedaan, A., de androkininefractie B. en de thylykininefractie C., dan zien we dat bij de tweede bepaling de androkinine fractie gemaakt is uit A + B. Het verschil der waarden q bij de tweede bepaling voor A + B en C is gering (20,5 en 50), terwijl bij de derde bepaling de androkininefractie alleen bestaat uit B (A is weggedaan). Het verschil der waarden q van B en C is hier veel grooter (0,81 en 148,) dit resultaat is dus te danken aan de afwezigheid van A. A moet blijkbaar ter wille van de scheiding geëlimineerd worden.

Eigenaardig is evenwel, dat de totale hoeveelheid hormoon bij de tweede bepaling bedraagt: $225 + 1090 = 1315$ E. thel. en $11 + 22 = 33$ E. andr., dus lagere getallen dan bij de derde bepaling: $39 + 1924 = 1964$ E. thel. en $48 + 13 = 61$ E. andr. Dit terwijl bij de tweede bepaling een fractie meer is onderzocht. Deze verschillende waarden zouden verklaard kunnen worden door de fysiologische schommeling in de hormoon-index. Bij een volgende bepaling (van beeren-urine) zullen we zien, dat de fractie A weinig hormoon bevat.

Het zij nog eens herhaald, dat de sterk verschillende waarden van q (0,81 en 148) de aanwezigheid van twee hormonen bewijzen.

HOOFDSTUK III, E.

QUANTITATIEVE BEPALING VAN BEEREN-URINE

Bereiding.

10 L. met azijnzuur zwak zuur gemaakte urine wordt ingedampt tot iets minder dan een liter. Met 2,5 L. benzol wordt eenige dagen geëxtraheerd. De afgescheiden benzol ziet niet rood, maar geel, met een iets bruine tint. Zij wordt ingedampt tot 45 cc., bij een temperatuur van 25-35° C. Met het zuigen gaat veel benzol weg; bijna 1,5 L. condenseert in den ontvanger, en de ingedampte vloeistof ziet nu donkerbruin. In een scheidtrechter wordt er 45 cc. 96 % alcohol bijgedaan, en tevens 3 cc. water, waarin 0,75 gr. NaOH is opgelost; dit goed geschudde mengsel blijft een uur staan. Toevoeging van 7 cc. water geeft geen scheiding, deze treedt pas den volgende morgen op na nog eens 5 cc. water te hebben toegevoegd. We hebben gebruikt totaal 100 cc. vloeistof, maar na de scheiding is er slechts 60 cc. alcohol en 40 cc. benzol over (verdamping? -volumecontractie?) Om te zien of er nog benzol in de alcoholische vloeistof zit, wordt nog eens 5 cc. water toegevoegd, er komt dan werkelijk nog wat benzol in een laagje boven de alcohol staan. Ook uit de benzol zakt nog wat alcohol-water naar beneden.

De benzolische oplossing wordt drooggedampt en het residu, met ether en olie behandeld, geeft het *preparaat A.* (12.5 cc.)

De ongeveer 60 cc. alcohol wordt met 60 cc. benzol geëxtraheerd. Daar de alcohol door de watertoevoegingen 60%-tig is geworden, treedt na enkele minuten reeds scheiding op, die echter niet volledig is, want de alcohollaag meet slechts 46 cc., de benzol laag daarentegen 76 cc., zoodat 14 cc. alcohol-water in de benzol is achtergebleven. Met veel moeite is een vrij volledige scheiding te bewerken. De alcohol wordt dan nog een tweede keer met benzol uitgetrokken. De twee benzolporties worden samengevoegd en geschud met 25 cc., alcohol 96 %, waaraan 5 cc. 2-normaal NaOH zijn toegevoegd. De scheiding gaat uiterst langzaam, daarom worden 20 cc. water toegevoegd om de alcohol uit de benzol te trekken. De lichtroode benzol geeft na de gewone behandeling de *androkinine-fractie B.* (10 cc.) De alcoholfracties worden bij elkaar gedaan en met HCl goed zuur gemaakt waarbij de tint lichtbruin wordt. Vervolgens wordt viermaal uitgetrokken met 150 cc. benzol; het eerste extract ziet troebelbruin, het tweede licht bruin (lichte bierkleur), het derde ook licht en helder en het vierde weer troebel lichtgeel. De 600 cc. benzol worden met soda gewasschen en geven na droogdamping de *thelykinine-fractie C.* (11 cc.)

Injecties bij mann. castraten.

PREPARAAT A (12.5 cc.)

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
onverdund	137	1	1	1	1	1	1S				Enkele mitosen per coupe.
	138	1	1	1	1	1	1	.1.			Meerdere mitosen p. c.
	139	1	1	1	1	1	1	.1.	1	1S	Een 10-tal mitosen p.c.
10 x verdund	140	1	1	1	1	1	1S				Geen mitose.
	141	1	1	1	1	1	1	1	1S		Geen mitose.
	142	1	1	1	1	1	1	1	1S		Geen mitose.
50 x verdund	143	1	1	1	1	1	1S				Geen mitose.
	144	1	1	1	1	1	1	1	1S		mislukt.
	145	controle									

PREPARAAT B. (10 cc.)

onverdund	146	1 1 1 1 1 1 1S		Geen mitose.
	147	1 1 1 1 1 1 1S		Meerdere mit., 2-3 p. gez.
	148	1 1 1 1 1 1 1S		In 1 coupe 5-tal mitosen.
10 x verdund	149	1 1 1 1 1 1 1S		In 1 coupe 5-tal mitosen.
	150	1 1 1 1 1 1 1S		Geen mitose.
	151	1 1 1 1 1 1 1S		Geen mitose.
50 x verdund	152	1 1 1 1 1 1 1S		Geen mitose.
	153	controle		Geen mitose.
	154	1 1 1 1 1 1 1 1S		Een 3-tal mit. in 4 coupe's

PREPARAAT C. (11 cc.)

onverdund	155	1 1 1 1 1 1 1S		Een 6-tal mitos. p.c. Ontstek.
	156	1 1 1 1 1 1 1 1S		Een 5-tal mit. p.c. Ger. Ontst.
	157	1 1 1 1 1 1 1 1 1S		Vrij veel mit., 3-4 p. gezichtsv
10 x verdund	158	1 1 1 1 1 1 1S		8 mitosen p.c.
	159	1 1 1 1 1 1 1 1S		1 mitose per 4 coupe's
	160	1 1 1 1 1 1 1 1 1S		3-4 mitosen p.c.
50 x verdund	161	1 1 1 1 1 1 1S		5 mitosen p.c.
	162	controle.		Geen mitosen.
	163	1 1 1 1 1 1 1 1 1S		Geen mitosen.

Injecties bij vrouw. castraten. PREPARAAT A.

	17	18	19	20	21	22
onverdund	1	1	—	—	+	
10 × verdund	1	1	—	—	±	+
50 × verdund	1	1	—	—	—	—
200 × verdund	1	1	+	+	+	+
	1	1	—	—	—	
500 × verdund	1	1	—	—	—	
	1	1	—	—	—	

PREPARAAT B.

	17	18	19	20	21	22
onverdund	1	1	—	+	+	
10 × verdund	1	1	—	—	—	—
	1	1	—	—	—	—
50 × verdund	1	—	—	—	—	—
	1	1	—	—	—	—
200 × verdund	1	1	—	—	—	—
	1	1	—	—	—	—
500 × verdund	1	1	—	—	—	—
	1	1	—	—	—	—

PREPARAAT C.

	17	18	19	20	21	22
	1	1	—	±	+	+
50 × verdund	1	1	—	+	+	
	1	1	—	±	+	—
	1	1	—	+	+	
200 × verdund	1	1	—	±	+	
	1	1	—	+	+	
	1	1	—	±	+	
	1	1	—	—	±	±
500 × verdund	1	1	—	—	±	—
	1	1	—	—	±	±

*Berekening van het aantal eenheden.**PREPARAAT A.*

N^o 137, 138 en 139 zijn alle positief, hoewel 137 gering. N^o 140-145 zijn negatief. Bij de controle is ontsteking; maar geeft mitose. Dat bij ontsteking toch wel mitosen kunnen voorkomen; bewijzen N^o 155 en 156. 0,6 cc. is dus positief. In het preparaat zijn dus $12,5 : 0,6 = 20$ E. Per Liter is dat 2 E. androkinine.

Wat het thelykinine-gehalte betreft, zien we, dat van de verdunning 10 twee positieve reacties voorkomen, van de verdunning 50 alles negatief is, terwijl bij verdunning 200 weer één van de drie positief is. Gezien echter het feit, dat die positieve reactie reeds optreedt, wanneer de positieve reacties nog in het negatieve stadium zijn, moeten we hier wel regeneratie van een stukje ovarium aannemen. 0,2 cc. verdunning 10 is dus positief. In het preparaat zijn $12,5 : 0,02 = 625$ E. en per L. 62,5 E. thelykinine.

De waarde Q van preparaat A bedraagt dus $62,5 : 2 = 31,25$.

PREPARAAT B.

N^o 147 en 148 zijn duidelijk positief. De moeilijkheid geeft hier N^o 154, waar een drietal mitosen in te zien zijn, terwijl de overige negatieve gevallen allen meer hebben gehad. Zelfs 146, met 0,6 cc. onverdund, is negatief, terwijl 0,8 cc. verdunning 50 positief zou zijn, 149 is ook positief, en nemen we deze als grens, dan is 0,6 cc. verdunning 10 positief, overeenkomende met 17 E. per L. Dit is de ongunstige waarde ten opzichte van de scheiding. Rekenen we 154 positief, dan krijgen we 62,5 androkinine eenheden per L.

Voor de berekening van het thelykinine gehalte is duidelijk, dat 0,2 cc. onverdund positief is. Dit geeft 5 th. E. per L.

De waarde Q van preparaat B wordt $5 : 17$, resp. $5 : 62,5$, dus 0,3 of 0,08.

PREPARAAT C.

Ook hier is geen volkomen regelmaat. N^o 161 is positief, maar 159 negatief, waarschijnlijk ten minste, 0,6 cc. verdunning 50 dus positief. In C. zitten : $11 : 0,012 = 917$ E. en per L. urine 92 androkinine eenheden. Voor het vrouwelijk hormoon rekenen we 0,2 cc. verdunning 200 positief, hetgeen overeenkomt met 1100 th. eenheden per L. urine.

De waarde Q dezer fractie is nu $1100 : 92 = 12$

Het totale gehalte der urine is $62,5 + 5 + 1100 = 1167,5$ th. E. en $2 + 17 + 92 = 110$ androkinine E. of

$2 + 62,5 + 92 = 155$ androkinine E.

Bezien we de verschillende fracties eens nader :

A heeft een waarde $q = \frac{62,5}{2} = 31,25$.

B heeft een waarde $q = \frac{5}{17} \left(\frac{5}{62,5} \right) = 0,3$ (0,08)

C heeft een waarde $q = \frac{1100}{92} = 12$.

Het verschil der quotienten q van de androkinine-fractie B en de thylykinine-fractie C is weer groot, hoewel iets minder dan bij de derde bepaling van den intersex. Dat verschil komt voornamelijk tot stand door het zeer geringe thylykininegehalte van B (5 M.E.) en het zeer hoge thylykininegehalte van C (1100). Bij C. is dus 220 maal zooveel thylykinine als bij B, daarentegen slechts 2 maal zooveel androkinine (het gemiddelde van de androkinine-waarden van B genomen : 17 en 62,5). Er volgt uit, dat C veel hormoon bevat.

Van de drie fracties bezi t A het laagste gehalte aan hormoon, maar haar waarde q neemt een ongedacht hooge plaats in ; namelijk hooger dan van C.

Ten slotte gaan we de urine van den intersex vergelijken met die van den beer.

Bij den intersex is het thylykinine-gehalte per Liter :

$225 + 1090 = 1315$ M.E. bij de tweede bepaling en

$39 + 1924 = 1963$ M.E. bij de derde bepaling.

Bij den intersex is het androkinine-gehalte per Liter :

$11 + 22 = 33$ M.E. bij de tweede bepaling; en

$48 + 13 = 61$ M.E. bij de derde bepaling.

Nemen we de gemiddelden der bepalingen, dan krijgen we :

1639 E. thel. en 47 E. andr.

Van de beeren-urine zijn de getallen :

$62,5 + 5 + 1100 = 1167,5$ E. thel., en

$2, + 40 + 92 = 134,$ E. andr.

De intersex heeft dus iets meer thelykinine en iets minder androkinine in de urine dan de beer.

HOOFDSTUK IV.

HET GESLACHTSAPPARAAT VAN HET INTERSEXUEELE VARKEN.

Na afloop der proeven werd het varken geslacht. Het genitaalapparaat bleek te bestaan uit de volgende deelen :

1. Twee *gonaden*. De rechter, een ovariotestis, bezit aan haar oppervlakte een viertal met vocht gevulde blazen. De met een spuitje verzamelde vloeistof (ongeveer 6 cc.) geeft in een hoeveelheid van 2 cc. bij de gecastreerde muis geen bronstreactie, en bevat dus geen thelykinine, of zeer veel minder dan normale liquor folliculi. De kystenwanden bestaan uit één- tot meerlagig epitheel. Er worden geen primair- en geen rijpende follicels waargenomen. Behalve de kysten is het geheele weefsel testiculair. De linker is een testis, die opgebouwd is op de wijze, die door KREDIET (1) uitvoerig is beschreven : indifferent epitheel der tubuli, geen differentiatie der geslachtscellen, en buitengewoon veel interstitieele cellen ; die driekwart van het gezichtsveld innemen.

Tegen de gonaden aan liggen de epididymides.

2. Twee *uterushoornen*, 30 en 65 cm. lang, een kort *corpus uteri*.

(1) Gonade und Uterus beim intersexuellen Schweine Baum-Festschrift.

De diameter der hoorns is in het midden ongeveer 2 cm. Aan de einden der cornua bevinden zich de gonaden.

3. Een 30 cm. lange *vagina*. In en tegen den vaginaalwand zien we in het craniale deel der vagina een conglomeraat van blaasjes, de grootste aan de buitenkant en de kleinere in den wand gelegen. Het zijn kysten met vochtigen inhoud en vormen bij intersexen een veel voorkomende verschijning. Zij worden door PICK pseudozaadblaasjes genoemd. Achter deze kliermassa en vòòr het ostium urethrae, bevindt zich een verdikt gedeelte van den vaginaalwand, welke verdikking veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van goed ontwikkelde zaadblaasjes.

De vagina gaat caudaalwaarts plotseling in de smalle urethra over; en de vulva is nauw, maar de clitoris is als een potlooddik staafje (waarin een eindweegs op te merken is een fijn lumen) over een lengte van meer dan 12 cm., in een opwaarts en vervolgens craniaal gerichte boog te vervolgen. Nabij den oorsprong liggen twee stukjes glad spierweefsel (m. retractor penis.).

HOOFDSTUK V.

SAMENVATTING.

In dit proefschrift wordt getracht, de vraag te beantwoorden, of in de urine van een intersex zich één (intersexueel) gonadaal geslachtshormoon bevindt, of wel, dat de twee bekende gonadale geslachtshormonen naast elkaar in de urine voorkomen. Er zijn twee wegen, die hiertoe ingeslagen kunnen worden, namelijk :

1° trachten één of twee hormonen in kristalvorm uit de urine te bereiden.

2° onderzoeken of verschillende fracties uit de urine gelijke of verschillende verhoudingen der werkzaamheden ten opzichte van de reacties voor mannelijk en vrouwelijk geslachtshormoon bezitten.

Als niet-chemicus en niet-physicus heb ik de tweede methode gevolgd, en dus getracht, fracties met sterk uiteenlopende thelyandrokinetische quotienten te bereiden. Indien dit niet mogelijk mocht blijken te zijn, dan zouden we tot de conclusie moeten komen, dat er in de urine één intersexueel hormoon is.

Voor de reactie op de werkzaamheid van het vrouwelijk hormoon wordt gebruikt de « vaginal smear » -methode bij de muis. Eerst wordt het normale celbeeld van het vaginaalsecretum tijdens den oestruscyclus bestudeerd, waarbij wij in tegenstelling van

Laqueur vinden, dat in vollen oestrus als regel enkel schollen aanwezig zijn, en geen kernhoudende epitheelcellen; noch leukocyten, noch slijm. Verder worden de castraties der vrouwelijke muizen beschreven en de controle dezer muizen op het definitief wegblijven der bronst. Gewezen wordt op het belang dezer controle en hoe ze uit te voeren (4 weken lang dagelijks).

Vervolgens wordt de bronstreactie gedaan met follikelvloeistof uit runder-ovaria, en ook met een alcoholisch extract ervan. De veranderingen van het vaginaalsecretum worden uitvoerig beschreven. De ovaria, na verwijdering der liquor folliculorum, bevatten nog hormoon.

Normale liquor folliculi, van rijpende en rijpe follikels, bevatten volgens onze bepaling 3-4 M.E. thylykinine, waarbij als eisch voor een positieve reactie het optreden van enkel schollen gesteld wordt (Laqueur geeft een hooger getal op).

25 M.E. thylykinine blijken onwerkzaam te zijn bij de zaadblaasreactie van de muis.

Voor de reactie op het mannelijk hormoon wordt gebruikt de zg. zaadblaasreactie.

De glandulae vesiculares worden zoowel bij den normalen als bij den gecastreerden muis nauwkeurig onderzocht. Bij het normale dier is het epitheel 16,5 tot 18 μ hoog, dit is iets hooger dan VOSS en LOEWE opgeven. De zône-verdeeling der cel, de kern, de granula en de mitochondriën worden beschreven. Ook worden de basaalcellen waargenomen, maar geen overgangen tot gewone epitheelcellen. Hierna wordt overgegaan tot de studie van de castraten-zaadblaas. De castraties zijn eenvoudig en betrekkelijk vlug uit te voeren. De grootte der zaadblazen na de castratie wordt nagegaan; het blijkt, dat de regressie na 6-8 weken is afgelopen.

De atrophie van prostaat en van ductus deferens wordt ook mikroskopisch vastgesteld.

Het zaadblaas-epitheel vertoont 5 weken na castratie de volgende kenmerken: de vorm van de cel is kubisch, de hoogte is

verminderd tot 10,96-12,60 μ . de zône-verdeeling verdwijnt (geen granula), de chromatine is niet meer fijn gekorrelt en de mitochondriën zijn korter geworden. De muscularis is smaller en het bindweefsel neemt toe.

Het antwoord op de vraag, hoeveel tijd na de castratie de atrophie voldoende ver is gekomen om de zaadblaas de groeireactie op het hormoon te laten ondergaan, luidt: vier weken.

Als bron voor mannelijk geslachtshormoon worden gekozen testes van geslachtsrijpe stieren. Er worden vier preparaten gemaakt om de zaadblaasreactie te leeren kennen. De bereidingen berusten op de volgende bewerkingen:

- extractie van het testikelweefsel met alcohol,
- de ingedampte alcohol met benzol extraheeren, de benzol indampen,
- lipoïeden met aceton neerslaan bij lage temperatuur,
- opnemen in verdunde alcohol en deze met hexaan wasschen,
- het hormoon in olijf-olie oplossen.

Het blijkt dat alle preparaten werkzaam zijn. De zaadblaasjes worden na de injecties duidelijk grooter en bevatten soms secretum, echter is makroskopisch de vergrooting niet altijd evenredig aan de toegediende hoeveelheid hormoon. In gevallen van makroskopisch twijfelachtige of zelfs negatieve reacties is echter wel verhooging van het epitheel aan te toonen. De makroskopische beoordeeling is dus niet voldoende, de epitheelhoogte behoort steeds gemeten te worden. Bij ruime en langdurige toediening wordt het epitheel weer geheel als het normale. De injecties gebeuren subcutaan met oliepreparaten en het beste vijf dagen achtereen. Na de sectie worden de blaasjes onmiddellijk op vloeistof van BOUIN gezet. 1-2 dagen fixeeren is voldoende.

Een testikel-extractie direct met benzol (dus geen alcohol) geeft ook wel een werkzaam preparaat, maar heeft praktische bezwaren; deze methode geeft niet de gezochte vereenvoudiging.

Testes van jonge stiértjes geven ook een werkzaam preparaat,

maar bevatten waarschijnlijk minder hormoon dan de testes van volwassen stieren.

Met een op de gewone wijze bereid preparaat wordt de zaadblaasreactie bij de rat gedaan; deze verloopt geheel analoog als bij de muis.

Met een volgend preparaat uit testes wordt een paar keer de kam-reactie bij den kapoen verricht. Van de kam en lellen nemen de maten na de injecties belangrijk toe, sommige met ruim 50 %. Na een paar maanden rust wordt de kapoen, waarvan kam en lellen weer de castraat-afmetingen hebben bereikt, opnieuw ingespoten met een nieuw preparaat, de reactie is nu nog iets sterker dan de eerste keer, ook wordt herhaalde malen kraaien waargenomen. De spoor wordt na de castratie grooter en de hormooninjecties hebben geen invloed op zijn ontwikkeling.

Tweemaal wordt uit mannen-urine een preparaat gemaakt ten einde het mannelijk geslachtshormoon in urine aan te toonen. De urine wordt ingedampt en dan met benzol geëxtraheerd, de benzolfractie levert een olie-preparaat. Uit de twee bereidingen blijkt, dat te ver dampen van de urine (tot strooperige massa) de extractie bemoeilijkt. de ingedampte urine moet goed vloeibaar zijn. Op deze wijze is gemakkelijk een preparaat te maken, dat het mannelijk geslachtshormoon bevat.

De urine van een mannelijk varken levert ook een werkzaam hormoon preparaat, maar bevat toxische stoffen, die peritonitis en subcutane ontstekingen bij de muizen veroorzaken. Als men het fleschje met het preparaat rustig laat staan, zakken die stoffen naar den bodem; de bovenstaande olie geeft geen ontsteking.

Een eerste proef om in normale beeren-urine de twee geslachtshormonen naast elkaar aan te toonen, levert wel eenig resultaat op, maar moet nog verbeterd worden. De bedoeling ervan was, twee fracties te bereiden, waarvan de eene zooveel mogelijk het mannelijk geslachtshormoon bevat, en de andere zooveel mogelijk het vrouwelijke. Geeft men de werkingswaarde van een fractie in man-

nelijk opzicht weer door a M.E. per Liter en in vrouwelijk opzicht door th M.E. per Liter, dan zal het quotient $\frac{th}{a}$ voor de fractie met het hoogste thelykinine-gehalte en het laagste androkinine-gehalte, veel grooter zijn dan voor de fractie met het laagste thelykinine- en het hoogste androkinine-gehalte.

Tot een bepaling dezer quotienten is de eerste scheidingsproef ontoereikend, er worden te weinig dieren ingespoten. Wel is bij de eene fractie makroskopische reactie der zaadblazen te zien, bij de andere fractie niet. Beide fracties geven echter positieve bronst-reacties, maar die reacties duren bij de fractie met de zaadblaas-reactie kort, bij de andere fractie lang. We mogen dus wel aannemen dat de eene fractie meer androkinine, en minder thelykinine bevat dan de andere.

Bij een volgende proef wordt de benzol-oplossing, uit beeren-urine verkregen, drooggedampt en het residu met water geschud. Het blijkt echter, dat deze waterige oplossing veel minder hormoon bevat dan de olie preparaten.

Het eerste onderzoek van de intersex-urine laat zien, hoe de twee fracties, bij alle ingespoten dieren positieve reacties geven, m.a.w. dat er niet in voldoende verdunning is ingespoten, en te weinig proefdieren zijn gebruikt. Toch leert deze proef ons iets belangrijks, namelijk dat contrôledieren, die zich in den zelfden bak met de ingespoten dieren bevinden, ook gaan reageeren, hetgeen verklaard moet worden door het per os opnemen van door de behandelde dieren uitgescheiden urine. Het is dus zeker mogelijk, dat als we in één bak eenige muizen met onverdund preparaat inspuiten, en andere met bv. 100 maal verdund preparaat, alle muizen positief reageeren, terwijl als we de muizen apart hadden ingespoten, de groep van de 100-malige verdunning negatief zou reageeren. Een strenge scheiding der proefdieren is dus noodzakelijk.

Het tweede onderzoek van de intersex-urine heeft de fracties opgeleverd waarvan de thely-androkinetische quotienten bepaald zijn op 20,5 en 50. Wel bevat de thelykinine-fractie vijfmaal zoo-

veel thelykinine als de androkinine-fractie, maar ook (tweemaal) meer androkinine dan de androkinine-fractie. Het is vooral de bepaling van het aantal androkinine-eenheden, die nog moeilijkheden oplevert. Bij deze proef wordt in gevallen, waar de makroskopische reactie dubieus is, en ook de epitheelhoogte geen zekere aanwijzing voor hormoonwerkzaamheid verschaft, een ander criterium gekozen: het optreden der mitosen.

Het is ons gebleken, dat bij lichte epitheelverhooging in het algemeen mitosen te zien zijn zelfs bij zuiver castraat-epitheel(1) zien we soms enkele mitosen. We vatten dit als hormoonreactie op, want bij niet ingespoten castraten zagen we nooit een mitose, ook niet na injecties met olijfolie. De mitosereactie is zeker gevoeliger dan de verhooging van het epitheel, zij treedt eerder op. Als de epitheelverhooging nog niet waarneembaar is, of twijfelachtig, komen reeds mitosen voor. Zij vormen dus de eerste verschijnselen van hormoonwerking, erna treedt epitheelverhooging en secretum op. Is de cel in volle functie gekomen, dan zien we geen mitosen meer. Een nadeel der methode is het zoeken naar mitosen; we zouden voor het aantoonen van één of enkele mitosen de zaadblaas in serie-coupe's moeten onderzoeken, hetgeen om praktische redenen niet uitvoerbaar is.

Keeren we terug tot de waarden 20,5 en 50. De onnauwkeurigheid, die de androkinine-bepaling nog aankleeft mag ons in deze betrekkelijk weinig uiteenlopende waarden geen teeken doen zien van de aanwezigheid van twee hormonen.

Het derde onderzoek van de intersex-urine geeft de beslissing. We hebben hier de eerste benzolfractie verwijderd en uit de alcoholfractie, door extractie van den benzol verkregen, twee fracties bereid, die een opmerkelijk waarde-verschil der quotienten vertoonen, namelijk $\frac{39}{48} = 0,81$ (androkinine-fractie) en $\frac{1924}{13} = 148$ (thelykinine-fractie).

Deze uitkomsten mogen als het bewijs beschouwd worden, dat

(1) Wat de celhoogte betreft.

mannelijk en vrouwelijk geslachtshormoon naast elkaar in de urine van den intersex voorkomen.

Vergelijken we de totale hoeveelheid hormoon per Liter urine, dan hebben we in de tweede proef gevonden : 1315 M.E. thylykinine en 33 M.E. androkinine, bij de derde bepaling resp. 1964 en 61. Een gemiddelde dus van 1639 M.E. th. en 47 M.E. andr.

Ten slotte volgt nog een quantitative bepaling van beeren-urine, met het doel de uitkomsten te vergelijken met de intersex-urine. De eerste benzolfraction wordt hier apart onderzocht, q ervan is $\frac{2}{62,5} = 31,25$. Er zit dus weinig hormoon in.

De androkinine-fractie heeft $q = \frac{5}{17}$ of $\frac{5}{62,5}$; gemiddeld $= \frac{5}{40} = 0,125$.

De thylykinine-fractie heeft $q = \frac{1100}{92} = 12$. Deze fractie bevat de meeste hoeveelheid hormoon.

De thylykinine-fractie heeft een waarde q , die honderd maal zoo groot is als de q van de androkinine-fractie. De scheiding der hormonen is dus hier weer duidelijk.

De totale hoeveelheid hormoon van de beeren-urine is : 1167 M.E. th. en 134 M.E. andr. De beeren-urine bevat iets meer androkinine en iets minder thylykinine.

Bij de berekening hebben we de aanwezigheid van mitosen geëischt voor een positieve reactie.

Ons oordeel over de zaadblaasreactie van VOSS-LOEWE, in het bijzonder de mitosen-test, is gunstig. Zij is gevoeliger dan de kamreactie en specifiek. Als biologische reactie heeft zij per se haar nadeelen, en zij kost meer tijd dan de kam-reactie, ook in de uitvoering van de zg. Schnell-Test, door LOEWE en VOSS aangegeven. Haar grooter gevoeligheid geeft haar een grooten voorsprong op de kamreactie.

De bronstreactie is reeds zoo vele keeren onderzocht, dat we volstaan met de aangetoonde betrouwbaarheid te bevestigen. De methode is ten slotte vrij ingewikkeld vergeleken bij een physische of chemische bepaling, maar geeft over het algemeen betrouwbare uitkomsten.

De gonaden van den intersex blijken te zijn een testis en een ovario-testis. Van de laatste is het ovariale deel slecht ontwikkeld, en bestaat uit een aantal kysten, waarvan de vloeistof weinig of geen thelykinine bevat en die dan ook niet als de oorzaak van het het hoge thelykinine-gehalte van de urine kan worden beschouwd.

Het feit reeds, dat er intersexen voorkomen met twee testes en een sterk ontwikkelden uterus, en de waarneming van KREDIET, dat de regressie van dien uterus pas optreedt als beide testen worden weggenomen, wijzen erop, dat in de gonaden, ook in den testis, een stof voorkomt, die den uterus tot ontwikkeling heeft gebracht, en hem in stand houdt. Ons onderzoek heeft uitgemaakt, dat deze stof het vrouwelijk geslachtshormoon is. Het mannelijk geslachtshormoon heeft de ontwikkeling van het mannelijk deel der geslachtsorganen voor zijn rekening genomen (penis of clitoris, prostata disseminata). De veronderstelling, dat één intersexueel hormoon de verschillende deelen van het geslachtsapparaat beheerscht, moeten we afwijzen.

De resultaten van ons onderzoek laten zich in de volgende punten samenvatten :

1. In de urine van een intersexueel varken worden de twee gonadale geslachtshormonen naast elkaar samengetroffen.
2. Een intersexueel hormoon is niet aangetoond kunnen worden.
3. De urine van den intersex bevat meer thelykinine en minder androkinine dan de urine van een beer.
4. De gonaden van den intersex zijn een testis en een ovario-testis. Het ovariale deel van de laatste bevat geen of weinig thelykinine.
5. Het testis-weefsel dezer gonaden vormt het vrouwelijke geslachtshormoon.

INHOUD

Hoofdstuk	Bldz.
I. INLEIDING.	9
II. OVER DE GONADALE GESLACHTSHORMONEN.	17
III. EIGEN ONDERZOEK.	39
A. Anatomie van de proefdieren.	41
Castraties.	44
Veranderingen na de castratie, geschiktheid voor de reactie.	45
A. 1. In betrekking tot het mannelijke hormoon.	41
A. 2. In betrekking tot het vrouwelijke hormoon.	67
B. Bereiding van hormoonpreparaten en het aantoonen van hun werkzaamheid.	48
C. Scheiding der hormonen in urine.	74
D. Urine-onderzoek van den intersex.	81
E. Quantitatieve bepaling van beeren-urine.	107
VI. HET GESLACHTS-APPARAAT VAN DEN IN- TERSEX.	115
V. SAMENVATTING.	117

FOTO N^r 1.

a : schol.

b : een laag aaneengekleefde schollen.

c : epithelium vaginae.

FOTO N^r 2.

a : kubisch epitheel.

FOTO N^r 3.

a : plooi, uit dubbele laag epitheel bestaande, waartusschen een zeer laagje bindweefsel, waarin gladde spiercellen. De cellen hebben een donkergekleurde basale en een lichtgekleurde perifere pool

b : muscularis.

c : secretum.

FOTO N^r 4.

a : vrij secretum.

b : secreetgranula.

FOTO N^r 5.

a en b : mitochondriën.

FOTO N^r 6.

a : mitosen.

FOTO N^r 7.

a : lig. lata.

FOTO N^r 8.

a : lig. lata.

b : uterusklieren.

FOTO N^r 9.

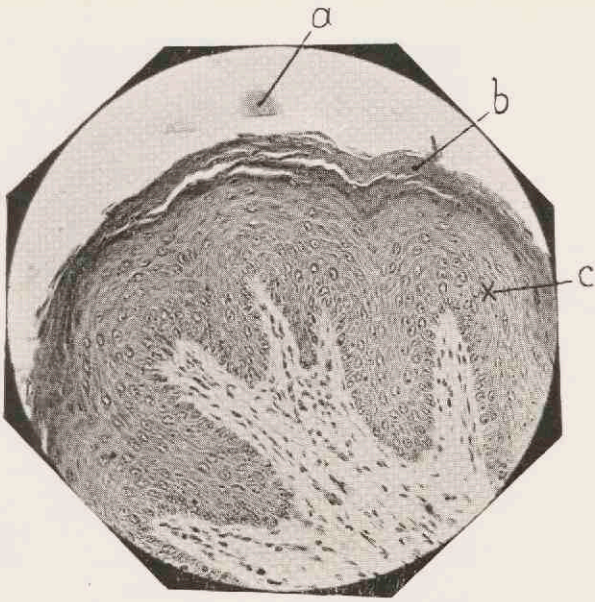
a : laag epitheel.

b : atrophische muscularis.

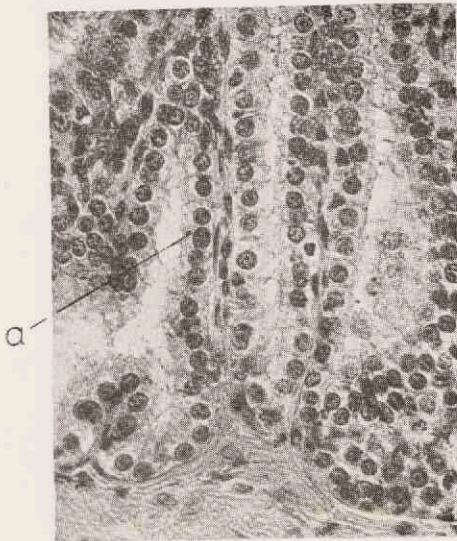
FOTO N^r 10.

a : hoog epitheel

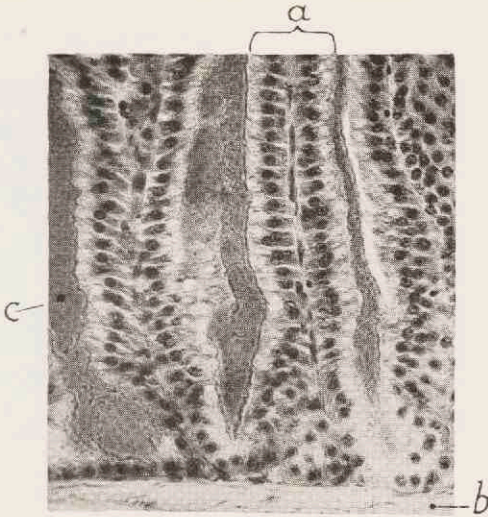
b : muscularis.



1
Oestrus muis. — Vagina.



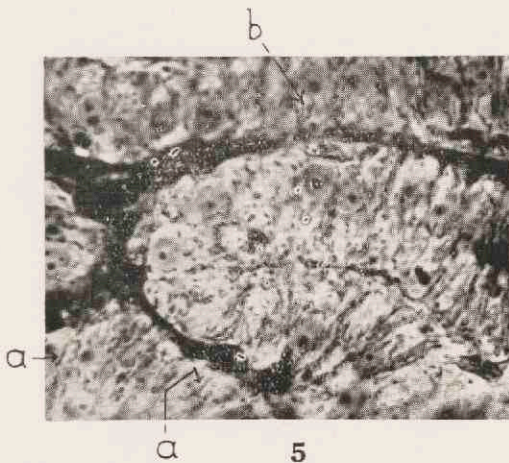
2
Gl. Vesicularis (muis). 4 weken
na de castratie. — Vergr. 430 ×



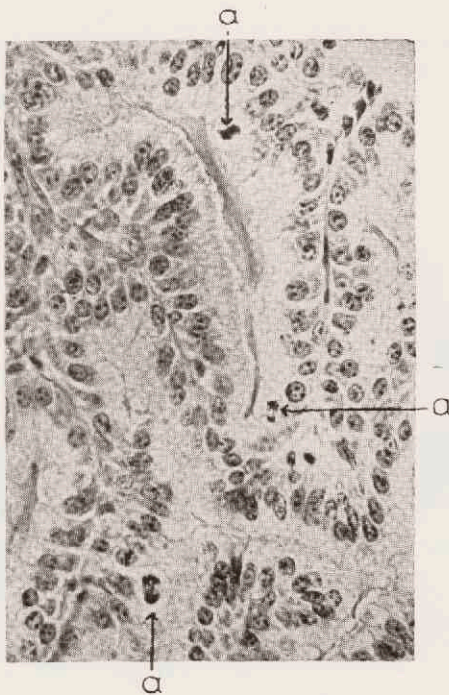
3
 Normale gl. Vesicularis van den
 muis. — Vergr. 130 ×



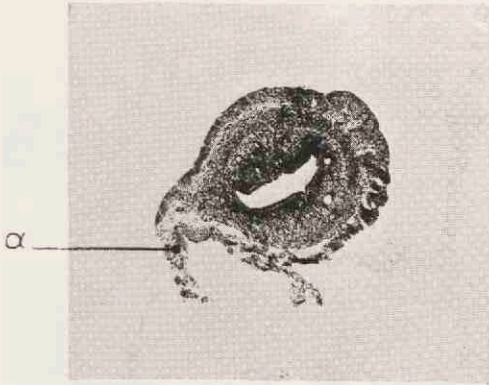
4
 Normale gl. Vesicularis van muis.
 Vergr. 430 ×



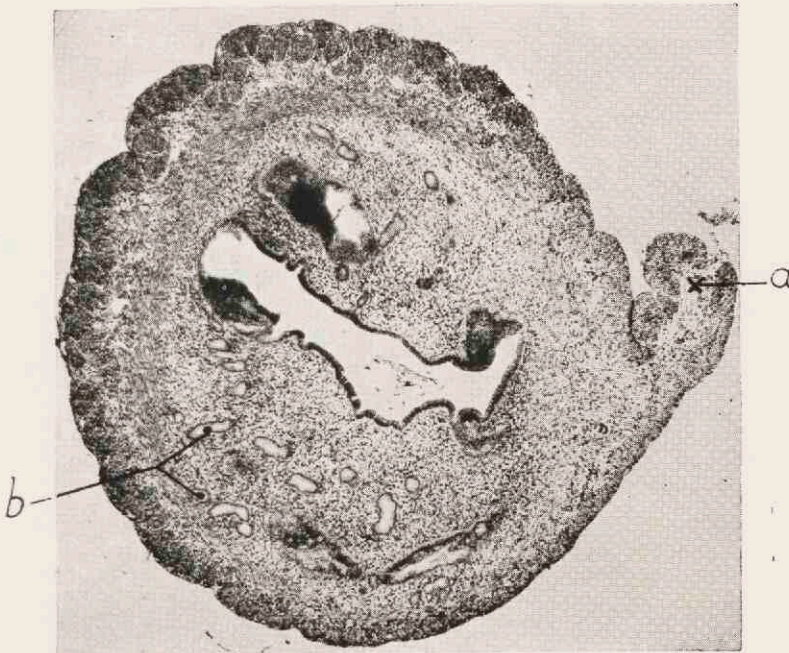
Normale gl. Vesicularis muis.
Vergr. 600 × (immersie)



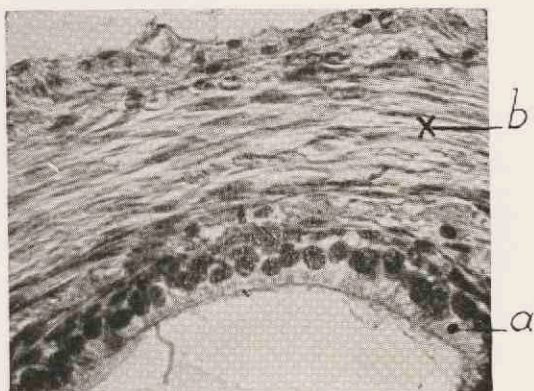
6
Zaadblaasreactie bij den muis.
Mitosen. — Vergr. 430 ×



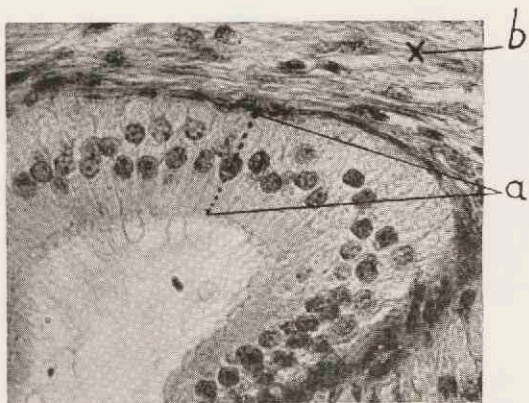
7
2-maandscastraat. Uterus muis
Vergr. 33 ×



8
2 maandscastraat, behandeld met vrouwelijk hormoon.
Uterus. — Vergr. 33 ×



9
 Castraat muis. Duct. deferens.
 Vergr. 410 ×



10
 Castraat muis behandeld met mannelijk hormoon
 Duct deferens. — Vergr. 410 ×

STELLINGEN.

I.

Een castraat is niet een geslachtsloos dier.

II.

In de vleeschkeuring dient de keuring op kwaliteit tot het strikt noodzakelijke beperkt te worden.

III.

De musculus glutaeus superficialis bij het paard is functioneel geen echte glutaeus.

IV.

Het is gewenscht, het praktische onderwijs in de vleeschkeuring voor den aanstaanden dierenarts uit te breiden.

V.

Bij de kwantitatieve bepaling van vrouwelijk geslachtshormoon moeten de diergroepen, die met verschillende verdunningen ingespoten werden, apart gezet worden.

VI.

De indeeling van PICK in schorsmiddelen en hersenstammiddelen betreffende de aangrijpingspunten der narcotica is niet houdbaar.

VII.

De splitsing der chirurgie in een voor groote en een voor kleine huisdieren is onjuist.

VIII.

De gonadale hormonen worden in de tusschencellen van LEYDIG gevormd.

