



Over willekeurige beïnvloeding van de geslachtsverhouding

<https://hdl.handle.net/1874/321566>

A. gn. 42, 1935

OVER WILLEKEURIGE BEINVLOEDING
VAN DE GESLACHTSVERHOUDING

S. R. MULDER

Algeres

OVER WILLEKEURIGE BEINVLOEDING
VAN DE GESLACHTSVERHOUDING

Diss. Utrecht 1935

OVER WILLEKEURIGE BEINVLOEDING VAN DE GESLACHTSVERHOUDING

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE AAN
DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS,
Dr. H. BOLKESTEIN, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBE-
GEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DE
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
VEEARTSENIJKUNDE TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 10 JULI 1935, DES MIDDAGS TE
2 UUR

DOOR

SIEBOLT ROELOF MULDER

DIERENARTS

GEBOREN TE GRONINGEN.

BIBLIOTHEEK
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

1935

W. KRAAL & ZONEN — UITGEVERS — DRIEBERGEN



*AAN MIJN MOEDER
AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER
AAN MIJN VERLOOFDE*

Bij het beëindigen van mijn academische studie, door de voltooiing van dit proefschrift, betuig ik gaarne allen, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebben medegewerkt, mijn hartelijke dank.

Het zij mij vergund hierbij in de eerste plaats te denken aan wijlen Prof. Dr. H. M. Kroon, die mij het onderwerp van dit proefschrift ter bewerking gaf en mijn eerste schreden op het moeilijke pad van het zelfstandige wetenschappelijke onderzoek heeft geleid. Zijn hulp zal ik nimmer vergeten.

Gelukkig waart Gij, Zeergeleerde van der Plank onmiddellijk bereid het werk van wijlen Prof. Kroon over te nemen en heeft Uw kennis en ervaring, Uw bezielend enthousiasme mij bij het bewerken van mijn dissertatie groote steun gegeven. Aan de tijd van onze samenwerking zal ik steeds de meest aangename herinnering bewaren.

Door het ontbreken van een hoogleeraar in de Veeteeltwetenschappen zijt Gij, Hooggeleerde Krediet door de faculteit aangewezen om als mijn Promotor op te treden. Voor het feit, dat U zich de daarvoor benodigde moeite ten mijnen behoeve hebt willen getroosten, als mede voor de prettige tijd, die ik in Uw instituut als assistent mocht doorbrengen, zal ik U steeds zeer dankbaar zijn.

U, Hooggeleerde Kruyt betuig ik gaarne mijn erkentelijkheid voor de gastvrijheid mij op het van 't Hoff-laboratorium verleend. Het groote gemak, waarmede Gij niet-deskundigen, de moeilijke vraagstukken op het gebied der colloïd-chemie weet uit te leggen, wekken terecht ieders bewondering.

Zeergeleerde Troelstra, U hebt mij door Uw steeds zoo gaarne gegeven hulp en door de gelegenheid, die Gij mij geeft, altijd van Uw rijke kennis gebruik te mogen maken, zeer verplicht.

Het voorrecht dat Gij, Zeergeleerde Brinkman mij hebt geschonken door mij in Uw laboratorium te Groningen te laten werken en mij van Uwe groote ervaring en veelomvattende kennis te laten genieten, kan ik niet genoeg op prijs stellen. Ook voor het feit, dat Gij steeds de verschillende toestellen te mijner beschikking stelt, ben ik U zeer dankbaar.

Ook U, Zeergeleerde S e e k l e s, hebt mij door Uw belangstelling in mijn werk en voor de steun en voorlichting, die Gij mij steeds in zoo ruime mate gaaft, zeer aan U verplicht en me alle redenen tot dankbaarheid gegeven.

Waarde van der Kooi, gaarne wil ik U nog eens op deze plaats dank zeggen voor de vele raadgevingen die ik in de loop der jaren van U heb mogen ontvangen en voor het materiaal dat Gij met zoo groote bereidwilligheid mij hebt helpen verzamelen.

Tenslotte betuig ik gaarne mijn erkentelijkheid aan allen, die op eenigerlei wijze mij behulpzaam zijn geweest bij mijn werk, in het bijzonder de Heeren Rijnders, van Wijngaarden en van der Valk.



INHOUD.

	blz.
HOOFDSTUK I.	
INLEIDING EN DOEL VAN HET ONDERZOEK . . .	1
HOOFDSTUK II.	
EXPERIMENTEEL GEDEELTE.	
Proeven met konijnen	10
Proeven met ratten	26
Proeven met schapen	30
Proeven met runderen	32
HOOFDSTUK III.	
ENKELE ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE p _H VAN HET SPERMA VAN DEN STIER	60
HOOFDSTUK IV.	
SCHEIDING DER TWEE SOORTEN SPERMATO- ZOIDEN DOOR MIDDEL DER KATAPHORESE . .	67
Inleiding	67
Doel van het onderzoek	68
Literatuuroverzicht	69
Eigen onderzoek	71
<i>Methode van onderzoek</i>	71
<i>Gang van het onderzoek</i>	82
<i>Resultaten</i>	91
CONCLUSIES	94
LITERATUUR	97

HOOFDSTUK I.

INLEIDING EN DOEL VAN HET ONDERZOEK.

Van ouds her is reeds het doel van vele onderzoekers geweest, een oplossing te vinden voor de vragen welke de factoren zijn, die het geslacht bepalen en of deze willekeurig te beïnvloeden zijn.

Deze onderzoekingen, wier aantal in de honderden loopt, reiken terug tot in de grijze oudheid. Vele theoriën en mededeelingen (in de 17de eeuw bestonden er reeds 262), het meerendeel niet ontbloomt van reine fantasie, hebben zich in de loop der tijden ontwikkeld en aanleiding gegeven tot allerlei onderzoekingsmethoden, waarnemingen en opmerkingen, die tot verklaring of opheldering hebben moeten dienen.

Het is niet onze bedoeling al de theoriën te memoreeren, die over de geslachtelijke differentiatie en beïnvloeding ervan handelen. Liever zouden wij een zeer beknopte inleiding willen geven, door uit de zoo omvangrijke literatuur enkele inzichten en meeningen naar voren te brengen.

Het ligt voor de hand, dat, zolang de mensch zich met geestelijke arbeid heeft bezig gehouden, hij ook getracht heeft zich in te denken in de wijze waarop vorming van het geslacht tot stand komt en over de mogelijkheid van willekeurige beïnvloeding. Bezie men verder de geslachtsverhouding bij de mensch en bij verschillende dieren, die door statistieken bekend is geworden, dan komt men volgens B e t h e tot de volgende getallen:

Tabel 1.

<i>vrouwelijke individuen.</i>	<i>mannelijke individuen.</i>
mensch 100	105.2
paard 100	110 (Wilkens); (Hertwig 99.7)
rund 100	107 (Wilkens 107.3)
varken 100	112 (Wilkens 111.8)
schaap 100	98
hond 100	110 (Wilkens)
konijn 100	104.6 (Basile)
rat 100	105 (Cuénot)
witte muis 100	79
duif 100	115

Er was weinig experimenteel materiaal ten opzichte van de getallen der geslachtsverhoudingen in het dierenrijk te vinden; de bekendste mededeelingen waren van Cuénot, Schleip en Hertwig.

Op het eerste gezicht geeft de bovenstaande tabel een geslachtsverhouding weer, welke tot 50 procent van beiderlei sekse nadert. Deze getalverhouding geeft echter niet goed het beeld weer van de juiste menigvuldigheid van de geslachten bij de conceptie. Zoo is het bekend, dat de werkelijke geslachtsverhouding van de mensch geheel afwijkt van die van de levende pasgeborenen. Zoo vindt men hier, indien de doodgeboren kinderen niet worden verwaarloosd, een veel grooter jongensoverschot, nl. in Duitschland 128.3, in Frankrijk 142.2, in Italië 131.1. Telt men verder, wat noodzakelijk is, het aantal abortusgevallen mede, dan valt de verhouding nog geheel anders uit nl. 160 ♂ : 100 ♀ (Siemens, Rauber, von Lenhossék). Het is dus in geenen deele geoorloofd te spreken van een wetmatigheid van de geslachtsverhouding van 50 %.

Wat de geslachtsverhouding van de dieren betreft, is het ook van het grootste belang te letten op de fouten die de statistische gegevens kunnen aanwijzen, die de abortus kan veroorzaken, doordat men bij jonge fetus het geslacht uitwendig niet altijd nauwkeurig heeft bepaald of heeft kunnen bepalen.

Indien we hierna de verschillende theoriën over de bepaling van het geslacht en ten slotte die, welke het geslacht vooraf zouden kunnen doen aangeven of de weg aangaven om het naar willekeur te beïnvloeden, eens overzien, dan moeten we tot de slotsom komen, dat deze alle ten nauwste samenhangen met het probleem van het tijdstip van het bepalen van het geslacht. Om een duidelijk overzicht, betreffende de verschillende theoriën te verkrijgen, kunnen we deze in drie groepen indeelen.

a. Progame geslachtsbepaling. Zij zou hier reeds vóór de bevruchting, in de geslachtscel, bestaan.

Deze groep bevat een groot aantal van de oudste theoriën. Het ligt voor de hand, dat de meeste oude opvattingen in verband werden gebracht met de aanwezigheid van twee geslachtsklieren, waarin men de geslachtscellen van de beide geslachten gelocaliseerd meende. Reeds Hippokrates was bv. deze meening toegedaan en dacht, dat bij iedere vrouw de rechter eierstok de mannelijke eieren, de linker de vrouwelijke eieren herbergde. Anderen verdedigden weer, dat het geslacht niet door de ovariën, maar door de

testes werd bepaald, alzoo door de spermatozoën en niet door de eicellen.

Enkele onderzoekers hebben gemeend experimenteel een modificatie van de geslachtsverhoudingen der nakomelingen te verkrijgen door bepaalde inwerkingen, voordat de copulatie plaats vond. A. Bluhm zou nl. na de behandeling van mannelijke muizen met coffeïne of yohimbine het mannelijke nakomelingencijfer kunnen opvoeren tot 120—126 tegenover 100 vrouwelijke. Zij kon verder bij witte muizen, zooals we lazen in het „Zeitschr. f. Indukt. Abstamm. und Vererb. lehre, Bd. 30, 1923", door acute alcoholiseering van de mannelijke muizen, het verhoudingscijfer der mannelijke nakomelingen van 79 op 122 brengen. Volgens haar zou de alcohol als narcoticum de beweeglijkheid van de chromatinrijkere vrouwelijk bepalende spermatozoïden in meer of mindere mate verminderen en de mannelijke spermïën, die minder chromatine bezitten, zoo een voorsprong geven in de wedloop naar het ovulum. Ook zijn enkele onderzoekers de meening toegedaan, dat inteelt bij de huisdieren een vermeerdering van de mannelijke nakomelingen zou geven.

In de laatste jaren denken sommigen, dat er anabolistische en katabolistische typen bij de eitjes voorkomen; de eitjes, die overrijk aan deutoplasmatische korrels zijn, zouden bij de bevruchting vrouwelijke nakomelingen geven en de eieren arm aan deutoplasma, mannelijke. Men heeft dit experimenteel trachten te beïnvloeden o.a. door lecithine injecties intraperitoneaal of subcutaan bij konijnenvoedsters; deze zouden het ovarium prikkelen tot het loslaten van eieren waarin veel eiwitvoedingsstoffen waren verzameld, die bij de bevruchting veel vrouwelijke dieren ter wereld brachten. Een zekere bevestiging hiervan is gevonden in de proeven van Leupold. Deze laatste verkreeg nl. na cholesterine voeding bij konijnen 75.5 % mannelijke en 24.5 % vrouwelijke vruchten. Na het toedienen daarentegen van lecithine 19.6 % ♂ en 80.4 % ♀. Op grond van deze uitkomsten is ook Leupold van inzicht, dat het geslacht in het ovulum is vastgelegd.

In de nieuwste tijd zijn er pogingen in het werk gesteld, om door middel van de kennis der endocrinologie het probleem over de beïnvloeding van het geslacht der nakomelingen op te lossen. De aanleiding hiertoe was het merkwaardige verschijnsel, dat bij tweelingdrachtigheid van het rund er vaak naast een normaal mannelijk kalf een intersexe aanwezig was, die uitwendig een vrouwelijk

schijnende tweeling was. Tandler, Keller en Lillie dachten dat deze intersexen oorspronkelijk normale vrouwelijke vruchten waren en de misvorming zou zijn ontstaan in het verloop der embryonale ontwikkeling door een hormoon, uitgaande van de mannelijke vrucht. Men noemde dit een hormonale intersexe. De eerste onderzoekers die het geslacht langs hormonale weg wilden beïnvloeden waren Fellner en Uhlmann. Zij injecteerden bij de moederdieren vóór de bevruchting geslachtshormonpreparaten als feminin, sistomensin en dergelijke. Bij deze proeven bleek een overwegend aantal vrouwelijke nakomelingen te ontstaan. Latere experimenten werden genomen door Gostimirovic, Koch en Reiprich. Deze vonden daarentegen een overwegend aantal mannelijke nakomelingen.

b. Meta- of epigame geslachtsbepaling. De geslachtelijke differentiatie zou hier in het verloop der embryonale ontwikkeling van het individu optreden.

Deze opvatting is vooral op de voorgrond getreden, toen men door betere onderzoekingsmethoden meer bekend raakte met de embryonale ontwikkeling. Men bemerkte, dat er een stadium was, waarop niets van een geslachtelijke differentiatie was te zien. Men dacht hieruit te moeten besluiten, dat het embryo dan in een geslachtloze toestand verkeerde of een hermaphrodiet was. Maar het niet herkennen van het geslacht van een embryo behoefde nog niet in zich te houden, dat dit in een toestand van geslachtloosheid verkeerde.

Verschillende onderzoekers meenden, dat het geslacht afhankelijk zou zijn van de voeding gedurende of in het begin van de graviditeit (Schenk, Ploss, Cuénot, Wilkens, Cohn). O. Schulze en anderen hebben dit echter niet kunnen bevestigen. Faber was van inzicht, dat regelmatig gevoederde runderen stierkalveren wierpen, als de conceptie in de tijd van de grootste lactatie had plaats gevonden. Werden de koeien in het begin van de winter bevrucht, in een tijd, waar een rijkelijke voeding plaats vond, dan werden er meer vrouwelijke kalveren geboren. Robinson vermeldde, dat cavia's na een aantal adrenalineinjecties 84.3 % mannelijke jongen wierpen inplaats van 60 % zonder behandeling en na cholineinjecties 90 % vrouwelijke.

c. Syngame geslachtsbepaling. Deze huldigt de meening, dat de geslachtelijke differentiatie optreedt vanaf het oogenblik der bevruchting.

Zoo waren Hofacker en Sadler van meening, dat de relatieve ouderdom van de ouders een groote invloed zou uitoefenen op de geslachtsverhouding. Was de vader jonger dan de moeder, dan zouden er, evenals bij gelijke ouderdom van de ouders, meer meisjes geboren worden, terwijl bij het ouder zijn van den vader er meer jongens ter wereld zouden komen. Anderen als Döderlein geloofden, dat het geslacht werd gedifferentieerd naar de kant van de meest „beanspruchte Erzeuger” (hengst en stier). De grondslagen van deze uitspraken dacht men te vinden in statistisch materiaal van mensch en dier. Volgens onderzoekers als Ahlfeld, Schramm, Hecker, Bidder, Düsing zou de leeftijd van de eerstbarende van veel gewicht zijn. Hoe ouder deze was, des te grooter zou het mannelijk overschot zijn.

De geboorten der mannelijke nakomelingen zouden volgens Goehlert voor het paard, volgens Morel voor het schaap, stijgen met de toenemende ouderdom der moederdieren. Ook Schlechter en Wilkens zijn het inzicht toegedaan, dat de merrie met toenemende ouderdom, meer hengst-veulens werpt, ongeacht de leeftijd der hengsten. Het jongensoverschot bij de mensch wilden von Lenhossek, Graff en Bidder verklaren, doordat bij de primiparae de mannelijke geboorten overwegen. Dit is weer door Gänssle op overtuigende wijze weerlegd. In de laatste tijd heeft Miss King met witte ratten bij de eerste worp een mannelijk cijfer gevonden van 115.9 : 100 vrouwelijke en bij de latere nesten 101.1 : 100.

We lazen van Thury, dat bij de runderen de eitjes, die bevrucht werden direct na het verlaten van het ovarium, een vrouwelijke nakomeling en die waar de conjugatie van ei en spermatozöid later optrad, een mannelijk kalf zouden voortbrengen; m.a.w. dat er een groote invloed zou worden uitgeoefend door het tijdstip der paring in de bronstperiode, een meening, die nu nog door verschillende fokkers wordt verkondigd. Hier zou het ei zelf de selectieve geslachtsbepalende rol spelen door middel van verschillende aantrekkingskrachten. Pearl en Parshley meenden dit in de laatste jaren te kunnen bevestigen, maar moesten het later weer herroepen, daar bij verder uitwerken van de statistiek geen samenhang tusschen bevruchtingstijd en geslacht kon worden aangetoond. Siegel dacht voor menschen in het algemeen te kunnen aannemen, dat de mannelijke nakomelingen ontstaan uit de bevruchting van oude eieren.

De onderzoekingen, die in de laatste tijd op het gebied der geslachtsbepaling zijn verricht, steunen op waarnemingen, die door fijne histologische methoden aan geslachtscellen zijn gedaan en tot resultaat hebben gehad, dat er bij mannelijke en vrouwelijke dieren kiemcellen zijn gevonden, die in het aantal der in de kern aanwezige chromosomen verschillen. Het is gebleken, dat er tweërlei chromosomen moeten worden onderscheiden, nl. autosomen en geslachts- of X-chromosomen. Aan de laatste zou de overerving van het geslacht gebonden zijn. Bij de zoogdieren hebben de mannelijke individuen één X- en de vrouwelijke twee X-chromosomen. Wanneer dus bij de reductiedeeling voor de vorming der kiemcellen het aantal chromosomen tot op de helft wordt teruggebracht, zullen die van het vrouwelijke dier n autosomen en één X-chromosoom bezitten, dus alle gelijk zijn. Bij het mannelijke zijn er kiemcellen met n autosomen en één X-chromosoom, maar ook met n autosomen alleen. Er bestaat hier dus een dimorfisme, dat zich soms uit in de aanwezigheid van een zgn. Y-chromosoom in die gevallen, waarin de lichaams- en geslachtscellen van het mannelijke dier gekenmerkt zijn door één X- en één Y-chromosoom. Er zijn dan kiemcellen met een X- en met een Y-chromosoom. Vindt nu bevruchting plaats, d.w.z. vereeniging van een mannelijke en een vrouwelijke kiemcel, dan bestaan er twee mogelijkheden. In de eerste plaats van een X-spermium en een X-ei en in de tweede plaats van een O of Y-spermium met een X-ei. In het eerste geval ontstaat er een overspermium of kiemdubbelcel met $2X$ - en in het andere een met $1X$ - of XY , m.a.w. dus in het eerste geval is de vrouwelijke chromosomenverhouding en in het tweede de mannelijke tot stand gekomen. Het eerste individu is vrouwelijk, het tweede mannelijk aangelegd.

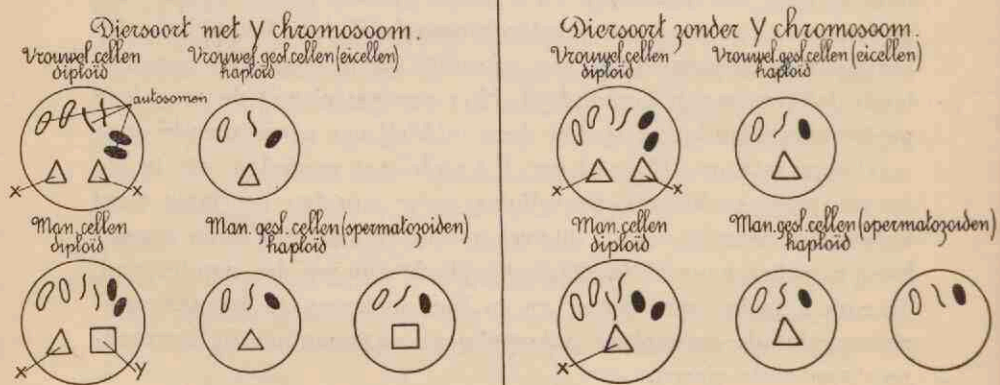


Fig. 1

Het voorgaande schema ¹⁾ geeft in enkele trekken het aangegevene weer.

Goldschmidt is bij zijn onderzoekingen tot de conclusie gekomen, dat er voor de bepaling van het zuivere geslacht aan de vrouwelijke en mannelijke factoren een bepaalde waarde moet worden toegekend, temeer daar hij van de veronderstelling uitgaat, dat ieder individu bisexueel is aangelegd, zoodat ook heterosexuele factoren in ieder dier aanwezig zijn, die, wanneer zij in een te groote mate voorkomen het normale geslacht zoodanig kunnen beïnvloeden, dat er van intersexualiteit sprake kan zijn. De vrouwelijke factoren F zouden aan de X-chromosomen, de mannelijke M aan de autosomen gebonden zijn. Het gevolg is, dat bij de zoogdieren het vrouwelijke individu mag worden voorgesteld door FF(M) en een mannelijk door F(M). In normale gevallen overweegt FF voldoende over M om de vrouwelijke factoren in de overhand te doen zijn en M voldoende over F om de mannelijke te laten winnen.

Deze hypothese van Goldschmidt, waarbij aan de geslachtsfactoren een quantitative werking wordt toegeschreven, wordt door een groot feitenmateriaal ondersteund en door het overgrootste deel der genetici geaccepteerd.

Voor ons onderzoek is het van belang, dat er twee soorten van spermatozoiden bij de zoogdieren zijn nl. met en zonder X, d.i. met en zonder F. Wanneer we in staat waren deze twee van elkander te scheiden, zou het mogelijk zijn het geslacht te beïnvloeden, omdat dan naar willekeur een der beide soorten tot de bevruchting kon worden toegelaten. Alle tot nu toe aangewende pogingen zijn mislukt. Misschien bestaat er een verschil in elektrische lading tusschen de beide en zou de scheiding tot stand kunnen worden gebracht door een spermasuspensie in een elektrisch veld te brengen.

Een verschuiving van de getallen der geslachtsverhouding zou in de veeteelt van enorme beteekenis zijn, daar de $\pm 50\%$ mannelijke dieren voor de voortteeling lang niet alle noodig zijn en speciaal in de rundveehouderij een vrouwelijk dier door de melkproductie meer op prijs wordt gesteld. In sommige gevallen echter, waar het gaat om een snelle verbreiding van gunstige eigenschappen, zal de fokker

¹⁾ Om het overzichtelijk te houden, zijn in de cellen slechts enkele autosomen aangegeven.

meer waarde hechten aan een mannelijke nakomeling. De aanleiding tot ons onderzoek waren de publicaties van prof. F. U n t e r b e r g e r, die vooral veel opzien verwekten in de Verenigde Staten en Canada na het 6de Internationale Genetische Congres in Ithaca 1932. Derhalve hebben wij gemeend deze proeven verder uit te werken, om door eigen onderzoek te kunnen uitmaken, of de meening van deze onderzoeker juist was.

Het was U n t e r b e r g e r bekend, dat men reeds lange tijd in de veeartsenijkunde bij de koeien, die slecht bevrucht werden, de vagina irriteerde met een waterige oplossing van natriumbicarbonaat. U n t e r b e r g e r, die directeur is van de Gynaekologische afdeling van het ziekenhuis te Königsberg, vond bij vele temporair steriele vrouwen een zeer hooge zuurgraad van het secretieproduct in de vagina. Wanneer hij nu de vaginae van deze patiënten liet uitspoelen met een zwakke oplossing van NaHCO_3 voor de coïtus, of de glans penis ermede inpoederde, werd de steriliteit opgeheven en volgens zijn eerste mededeeling in 1930 kon hij in alle (53) gevallen constateeren, dat er de geboorte van een jongen op volgde. Hij meldde van één geval, dat er een meisje werd geboren, maar weet dit aan het niet goed nakomen van zijn voorschriften.

U n t e r b e r g e r bericht verder eveneens van vier vrouwen, die vóór de conceptie met melkzuur waren behandeld. In alle vier gevallen werden er meisjes geboren.

Volgens deze onderzoekingen zou dus de zuurgraad van de vagina een groote selectieve rol spelen bij de bepaling van het geslacht; een mogelijkheid, die volgens hem door anderen nog niet onder de oogen was gezien. In 1924 had A g n e s B l u h m er echter reeds op gewezen, dat de mogelijkheid niet was uitgesloten, dat de reactie van het vaginaalsecretum een invloed zou kunnen uitoefenen op het geslacht, m.a.w. dat de eene soort spermatozoën door een zuur of alcalisch secretieproduct sterker in hun activiteit zou worden beïnvloed dan de andere en derhalve gemakkelijker of minder gemakkelijk het ovulum zou bereiken. Zij was daarna met muizen-proeven begonnen om uit te maken, welke invloed de zuurgraad zou kunnen hebben. Deze waren echter bij de eerste publicatie van U n t e r b e r g e r nog niet voltooid. Zoo ontspan zich tusschen deze beide onderzoekers min of meer een strijd om de prioriteit van dit vraagstuk.

In 1932 publiceerde U n t e r b e r g e r, dat zijn onderzoekingen bij vrouwen, behandeld met NaHCO_3 zich hadden uitgebreid tot

74 gevallen en uitsluitend jongens waren geboren. In dit artikel vermeldt hij ook, hoe hij zich de beïnvloeding van de aciditeit van de vagina op het geslacht van het jonge individu indenkt. Hij verklaart: „..... dass ich auf dem Boden der modernen Zoölogie stehe und die Bedeutung des X-Chromosoms völlig anerkenne“. Hij komt tot de hypothese, dat door het meer alcalisch maken van de vagina vóór de cohabitatie, de mannelijk vormende spermatozoën een voorsprong krijgen op de vrouwelijk vormende, daar de laatste in het milieu met een lagere zuurgraad zich niet zoo snel voortbewegen kunnen, terwijl in een omgeving met een lagere p_H de rol omgekeerd is.

Evenals de aciditeit van het vaginaalsecretum, zou die van het sperma een beslissende invloed hebben. **U n t e r b e r g e r** vat zijn theorie als volgt samen: „In der Mehrzahl der Ehen, gleicht sich der Alkaligehalt des männlichen Spermas mit dem Säuregehalt der Vagina aus, sodass die Chancen für Knaben und Mädchen die gleichen sind. So möchte ich es auch erklären, dass bei zweieieige Zwillingen ein Kind ein Knabe, das andere ein Mädchen sein kann. In einem kleinen Prozentsatz der Ehen trifft ein stark alkalischer Partner auf eine Frau mit schwach saurem Vaginalsekret. Das sind die Ehen, die in der Hauptsache oder nur Knaben produzieren. Umgekehrt wird in ebenfalls kleinem Prozentsatz ein schwach alkalischer Mann mit einer Frau mit hohem Milchsäuregehalt fast nur Mädchen zur Welt bringen“.

Samen met den dierenarts **W. K i r s c h** heeft **U n t e r b e r g e r** zijn methode getoetst aan dier-experimenten. Ze behandelden op een bepaalde manier konijnen vóór de coïtus met NaHCO_3 of acidum lacticum en konden hiermede zijn theorie bevestigen. Verder werden er proeven met runderen genomen.

Daar de mededeelingen van **U n t e r b e r g e r** een reusachtige belangstelling vonden in de medische wereld en zij van een veeteeltkundig oogpunt uit ook van groote beteekenis zouden kunnen zijn, hebben wij gemeend dit vraagstuk mede te moeten uitwerken aan de hand van proeven bij verschillende dieren.

HOOFDSTUK II.

EXPERIMENTEEL GEDEELTE.

Proeven met konijnen.

Unterberger heeft, in samenwerking met Kirsch, zijn hypothese omtrent de invloed van de zuurgraad van de vagina op het bepalen van het geslacht van het aanstaande individu getoetst aan experimenten met konijnen, die daarom zoo geschikt waren voor deze proeven, omdat bij hen de ovulatie door de copulatie wordt opgewekt. Zoodoende is er een groote mate van waarschijnlijkheid, dat de spermïën direct de eitjes bereiken.

Zij behandelden de dieren voor de copulatie op verschillende manieren:

a. bicarbonas natricus werd in poedervorm met behulp van een pipet in de vagina gebracht. Het nadeel van deze methode was, dat de poeder zich niet homogeen verdeelde en de ingebrachte hoeveelheid niet zuiver was aan te geven.

Vier voedsters werden zoo behandeld en gepaard met denzelfden ram. Het resultaat was: 19 ♂ en 6 ♀.

b. Injicieeren van een 0.25 % oplossing (tot 2 c.c.) NaHCO_3 . Ook hier ging een deel na inspuiting verloren. Vergelijking van wel en niet behandelde voedsters gedekt door denzelfden ram gaf als resultaat: 11 voedsters zonder behandeling, samen 13 worpen, 28 ♂ en 56 ♀. Dezelfde voedsters, uit 19 worpen, na behandeling, 80 ♂ en 41 ♀.

c. Uitspoelen der vagina met een oplossing van 0.75 % — 1 % acidum lacticum. Alle dieren bleven steriel. De vagina werd na een dergelijke behandeling misschien te stroef of zoo geïrriteerd, dat de ram niet werd toegelaten.

d. Om de concentratie bij alle dieren gelijk te krijgen, werden staafjes in de vagina gebracht met de volgende samenstelling: 1.0 gram oleum cacao en 0.25 gram NaHCO_3 .

Het resultaat der paring van 9 konijnen met denzelfden ram was 36 ♂ en 15 ♀.

e. Suppositoria bestaande uit oleum cacao met 0.75 % melkzuur. Vijf voedsters werden na deze behandeling gepaard met het resultaat 5 ♂ en 16 ♀.

Wordt dit laatste resultaat vergeleken met dat, hetwelk na de

behandeling met NaHCO_3 (verhouding van de vruchten is 142 ♂ en 65 ♀) werd verkregen, dan schijnt het op het eerste gezicht, dat de behandeling met de basische stof een duidelijke verschuiving van de geslachten geeft naar de mannelijke kant en met de zure naar de vrouwelijke. Het bezwaar van deze onderzoeken is evenwel, dat er bij de contrôle-dieren van *U n t e r b e r g e r* met hun 28 ♂ en 56 ♀, een zeer abnormale geslachtsverhouding bestond nl. 33 %. (Onder geslachtsverhouding wordt verstaan het aantal mannelijke individuen per 100 totaal geboren). Normaal is ze (G.V.) bij konijnen $\pm 50\%$.

Onze proefnemingen zijn verricht bij konijnen van het Veeteeltkundig Instituut te Utrecht en bij die van eenige bekende, serieuze fokkers in ons land. Derhalve is het mij een aangename taak deze personen mijn dank te betuigen en in het bijzonder de Heeren *J. A. Schippers* te Deventer en *W. Wassink* te Hengelo (O.), voor de groote bereidwilligheid en hulpvaardigheid om hun dieren hiervoor beschikbaar te stellen.

De dieren waren voorzien van nummers in de ooren en de geregistreerde waren getatoueed. Om de tabellen te vereenvoudigen zijn deze tattooage-nummers hier niet vermeld.

In de eigen proeven hebben we steeds de gebruikte rammen met de later te behandelen voedsters gecontroleerd op de G.V. Dit was in de verschillende fokbedrijven echter niet mogelijk.

Van verschillende voedsters is eerst, met behulp van de indicatoren-methode, de pH van de vagina bepaald, om een indruk te krijgen van de normale zuurgraad. Hiervoor maakten we gebruik van filtreerpapiertjes, die eerst gedrenkt werden in een verzadigde oplossing van een indicator in gedestilleerd water (0.03 — 0.05 %) en in een zuurvrije omgeving werden gedroogd. Als indicator gebruikten we phenolrood, lakmoes, broomthymolblauw, broomcresolpurper, broomphenolblauw, methylrood en phenolphthaleïne (2 % alcoholische oplossing). De laatste geeft een kleuromslag en geen geleidelijke overgang.

Deze papiertjes bleven eenige tijd in de vagina en de verkregen kleur werd vergeleken met een geijkte kleurenschaal van de desbetreffende indicator.

Het bleek ons, dat bij verschillende individuen de papiertjes zeer onduidelijk getint werden en niet ieder gedeelte hiervan dezelfde kleur vertoonde. Een duidelijke pH bepaling was op deze wijze niet mogelijk. Schattenderwijze leverde het grootste aantal dieren een

reactie $p_H \pm 7.4$. Een enkele keer vonden we een p_H in de buurt van 6.5 of 8.4.

Na deze zuurgraadbepalingen werden de konijnen door ons behandeld en de verkregen resultaten in tabellen weergegeven.

Van verschillende reeksen rekenden we met behulp van de middelbare fout van de geslachtsverhouding uit, of het verkregen resultaat was toe te schrijven aan de behandeling of aan het toeval. Zoals men weet, is de middelbare fout (m) of ($m.f.$) van een waarde, een getal, dat de nauwkeurigheid van deze waarde aangeeft. Zouden we in plaats van het nu door ons gebruikte aantal dieren dezelfde proeven herhalen, met een aantal dat b.v. 1000 maal zoo groot was, dan zou de geslachtsverhouding ($G.V.$) zeer waarschijnlijk niet precies dezelfde zijn als de gevonden $G.V.$ uit onze proef. De middelbare fout door ons gevonden geeft echter het recht om met een waarschijnlijkheid van ruim 99 % aan te nemen, dat al zou het proefmateriaal 1000 maal grooter worden, het gemiddelde tusschen $G.V. + 3 \times m$ en $G.V. - 3 \times m$ ligt.

Om nu het verschil te bepalen tusschen de reeks met zuur of met alcali behandeld en de reeks, die niet is behandeld, pasten we de volgende formule toe:

$$G.V._{diff.} \pm m_{diff.} = G.V_1 - G.V_2 \pm \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$$

$G.V_1$ en $G.V_2$ geven aan de geslachtsverhouding der dieren, die resp. behandeld en onbehandeld zijn.

m_1 is de middelbare fout van $G.V_1$.

m_2 is de middelbare fout van $G.V_2$.

De middelbare fout wordt berekend met behulp van de formule:

$$m = \sqrt{\frac{\% \delta \times \% \text{♀}}{\text{totaal aantal}}}$$

Dr. van der Plank was zoo vriendelijk de uitkomsten van enkele reeksen met oogenschijnlijk positieve resultaten ook nog te controleren volgens de X^2 -methode van H. P e a r s o n (zie Biological Monographs and Manuals; R. A. F i s h e r) 3e druk, blz. 82 en Medical Biometry and Statistics R. P e a r l, 2e druk blz. 318).

1. In de vagina van 10 voedsters werd vóór de cohabitatie 1 à 2 c.c. versch bereide 0.25 % NaHCO_3 oplossing geïnjicieerd. We verkregen de volgende resultaten:

Tabel 2.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling	
	♂	♀	♂	♀
H 1	3	1	2	5
H 2	5	4	1	4
H 3	1	4	3	1
H 4	2	6	1	4
H 5	3	3	4	2
H 6	9	—	9	3
H 7	6	4	—	—
H 8	1	7	6	—
H 9	3	5	4	5
H 10	1	4	2	4
	—	—	—	—
	34	38	32	28

De copulatie geschiedde bij deze serie steeds door denzelfden ram. G.V. zonder behandeling is 47.22 %.

G.V. met behandeling is 53.33 %.

m_1 is 5.88.

m_2 is 6.44.

G.V. diff. $\pm m_{\text{diff.}}$ = 6.11 ± 8.72 .

De middelbare fout is grooter dan $\frac{1}{3} \times$ het verschil; dus mag met dit verschil niet gerekend worden en moet op grond van deze proeven worden geconcludeerd, dat geen verschil door de behandeling aantoonbaar is.

2. Zes voedsters werden behandeld door vóór de copulatie de vagina te irriteren met 1 % NaHCO_3 oplossing.

Tabel 3.

Aanduiding Voedster	Zonder behandeling		Met behandeling		Ram
	♂	♀	♂	♀	
Kr. 1	8	—	1	4	No. 654 „Haaskleurige”
Kr. 2	2	3	2	7	
Kr. 3	1	4	5	—	
Kr. 4	5	5	2	6	
Kr. 5	3	2	9	3	
Kr. 6	1	—	1	2	
	—	—	—	—	
	20	14	20	22	

Ook bij deze serie gebruikten we steeds denzelfden ram.

G.V. zonder behandeling is 58.82 %.

G.V. met behandeling is 47.62 %.

m_1 is 8.44.

m_2 is 7.71.

$G.V._{diff.} \pm m_{diff.} = 11.20 \pm 11.43.$

Ook hier mogen we niet spreken van een door de behandeling ontstane geslachtsverschuiving.

Bij de volgende proeven hebben we gebruik gemaakt, in navolging van *Unterberger* en *Kirsch*, van staafjes bevattende oleum cacao met bic. natric. of acid. lact. Het voordeel hiervan is, dat het slijmvlies minder geïrriteerd wordt, daar het met een laagje cacaoboter wordt bedekt; bovendien blijft de totale hoeveelheid van de gebruikte stof in de vagina.

Unterberger en *Kirsch* namen, zooals reeds is medege-deeld, voor ieder suppositorium 1 gr. ol. cacao en 0.25 gr. $NaHCO_3$. Het bleek ons echter, dat het lastig was deze betrekkelijk groote suppositoria in de vaginae van de konijnen te brengen. Alleen bij de grootste rassen en dan nog met veel moeite, was dit mogelijk. Bij de middelgroote en kleine rassen, zooals we hier veelal hebben, was het ondoenlijk. Indien een nootje was samengesteld uit 0.5 gr. ol. cacao was dit veelal nog te dik voor onze dieren. Wij maakten derhalve suppositoria waarin we de hoeveelheid cacaoboter verminderden.

Na het in de vagina brengen van het staafje werd eerst zoolang gewacht, totdat de boter was gesmolten en zich goed in de vagina-ruimte had verdeeld. De voedster werd zoolang met het hoofd naar beneden gehouden en de vagina gesloten. Daarna werd het dier bij den ram gezet en niet omgekeerd, daar de copulatie vlugger plaats vindt, indien het mannelijke dier niet in een vreemde omgeving wordt gebracht. Als de voedster bronstig was, geschiedde de coïtus dikwijls direct. Meestal vond eenmaal copulatie plaats, een enkele maal twee keer.

De suppositoria werden steeds versch bereid met behulp van een pers.

3. Suppositoria van een samenstelling 1 gr. ol. cacao en 0.25 gr. bic. natric. Deze staafjes werden vanwege de grootte slechts bij enkele konijnen toegepast. De p_H van de vagina lag na de behandeling in de buurt van 7.8.

Tabel 4.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling	
	♂	♀	♂	♀
Kr. 25	2	4	3	1
Kr. 25	—	—	2	—
Kr. 25	—	—	1	7
Kr. 26	4	1	6	4
Kr. 29	2	5	1	3
Kr. 29	—	—	4	4
Kr. 29	—	—	—	3
	—	—	—	—
	8	10	17	22

De copulatie geschiedde steeds door denzelfden ram.

G.V. zonder behandeling is 44.44 %.

G.V. met behandeling is 43.59 %.

m_1 is 11.71.

m_2 is 7.94.

G.V. diff. $\pm m_{diff.} = 0.85 \pm 14.15$.

Bij dit geringe aantal dieren, dat voor deze proef beschikbaar was en uit de geconstateerde G.V. kan mathematisch ook geen aantoonbaar verschil geconcludeerd worden.

4. Suppositoria van de samenstelling 0.5 gr. ol. cacao en 0.25 gr. bic. natric.

Deze nootjes waren voor de meeste rassen nog te groot om in de vagina te worden gebracht.

De p_H in de vagina lag na het smelten van het staafje ook in de buurt van 7.8.

Tabel 5.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling	
	♂	♀	♂	♀
Kr. 33	3	1	2	—
Kr. 34	7	4	6	2
Kr. 34	—	—	1	4
Kr. 34	—	—	4	3
Kr. 36	4	4	1	7
Kr. 39	2	7	—	6
Kr. 40	6	5	2	7
Kr. 40	—	—	1	—
Kr. 40	—	—	2	—
Kr. 41	4	2	4	1
Kr. 41	4	2	3	5
	—	—	—	—
	30	25	26	35

De copulatie geschiedde steeds door denzelfden ram.
G.V. zonder behandeling, 54.54 %.

G.V. met behandeling, 42.62 %.

m_1 is 6.71.

m_2 is 6.33.

G.V. $\text{diff.} \pm m_{\text{diff.}} = 11.92 \pm 9.28.$

Dat uit een betrekkelijk kleine reeks waarnemingen niet te snel een conclusie kan worden getrokken, blijkt uit bovenstaande tabel. Door de behandeling van de voedsters met NaHCO_3 kregen we een geheel andere G.V. dan zonder behandeling. Uit de becijfering blijkt echter dat het verschil mathematisch niet bevestigd is.

Zouden we een werkelijk verschil door de behandeling mogen aannemen, dan moest het G.V. verschil minstens $3 \times$ grooter zijn dan zijn middelbare fout.

5. Bacilla van de volgende samenstelling:
0.5 gr. ol. cacao en 0.075 gr. acid. lacticum.

De p_{H} in de vagina na de behandeling was ± 4 .

Tabel 6.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling	
	♂	♀	♂	♀
H 1	3	1	4	5
H 2	5	4	2	—
H 3	1	4	5	1
H 4	2	6	7	5
H 5	3	3	—	6
H 6	9	—	1	1
H 6	—	—	2	4
H 7	6	4	3	1
H 8	1	7	—	5
H 9	3	5	—	4
H 10	1	4	1	3
H 12	—	2	4	6
H 13	—	—	3	5
	34	40	32	46

Alle voedsters werden gecopuleerd door denzelfden ram.
G.V. zonder behandeling is 45.95 %.

G.V. met behandeling is 41.03 %.

m_1 is 5.79.

m_2 is 5.57.

G.V. $\text{diff.} \pm m_{\text{diff.}} = 3.92 \pm 8.04.$

In deze serie vonden we, zooals uit het bovenstaande blijkt, een G.V. verschil, dat niet $3 \times$ grooter is dan zijn middelbare fout.

6. Daarna hebben we de volgende samenstelling genomen van de nootjes:

0.2 gr. ol. cacao en 0.050 gr. acid. lacticum en

0.2 gr. ol. cacao en 0.075 gr. acid. lacticum.

Na het inbrengen van deze bacilla zagen we echter een oedemateuse zwelling van de vagina, met later het optreden van necrose; zeer waarschijnlijk tengevolge van het verminderen der hoeveelheid cacaoboter.

De meeste proeven zijn verricht met de volgende twee samenstellingen:

7. 0.125 gr. ol. cacao en 0.250 gr. NaHCO_3 .

De lengte van deze staafjes was 1.85 c.M. en de dikte 4 m.M.

De p_H in de vagina na de behandeling was meestal 7.8.

Tabel 7.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling		Aanduiding ram
	♂	♀	♂	♀	
997	—	5	1	3	979
998	2	3	1	4	"
995	3	6	5	4	"
1000	2	1	2	2	"
992	4	3	4	1	"
992	—	6	4	5	"
992	—	—	2	—	"
993	3	5	6	—	"
989	4	7	2	1	"
989	—	—	4	7	"
983	1	3	—	5	"
972	5	—	3	2	"
971	6	3	4	1	"
988	1	7	—	3	"
990	—	—	6	2	"
974	2	1	3	6	"
974	—	—	4	2	"
969	3	2	5	1	"
969	—	—	2	5	"
983	4	—	5	4	970
987	1	6	2	1	"
980	9	3	—	6	"
984	4	1	3	7	"
984	—	—	2	—	"
981	1	4	1	5	"
982	2	7	2	1	"
978	1	2	2	1	"
R 1	1	2	9	1	„de witte”
R 2	5	3	—	2	"
R 3	1	8	7	3	"
Kre 1	4	3	4	5	"

Kre 2	2	1	1	3	"
Kre 4	4	3	4	2	"
Kre (gele)	1	3	—	6	975
K 1	—	—	2	3	"
K 2	—	—	4	6	"
K 4	—	—	2	5	"
K 7	4	1	1	7	"
K 9	3	2	6	—	"
T 5	—	—	3	1	963
T 1	—	—	4	5	"
T 2	6	—	2	7	"
T 4	4	7	6	1	"
T 4	—	—	3	1	"
W 7	—	—	2	4	niet steeds denzelfden ram
W 11	—	—	2	4	"
W 12	—	—	1	1	"
W 15	—	—	6	1	"
W 16	—	—	1	5	"
W 18	—	—	6	1	"
W 19	—	—	6	1	"
W 20	—	—	3	1	"
W 21	—	—	6	2	"
D 1	—	—	3	4	"
D 4	—	—	3	1	"
D 5	—	—	1	2	"
D 6	—	—	3	—	"
D 12	—	—	1	4	"
D 18	—	—	4	3	"
D 23 a	—	—	2	2	"
D 23 b	—	—	5	3	"
D 29	—	—	2	3	"
D 30 a	—	—	1	3	"
D 30 a	—	—	2	—	"
D 33	—	—	2	—	"
D 35 a	—	—	3	5	"
D 37	—	—	3	—	"
D 48	—	—	3	2	"
D 49	—	—	2	2	"
D 51	—	—	8	2	"
D 52	—	—	—	5	"
D 53	—	—	2	1	"
	93	108	220	196	

G.V. zonder behandeling is 46,27 %.

G.V. met behandeling is 52,88 %.

m_1 is 3.52.

m_2 is 2.45.

G.V. diff. $\pm m_{diff.} = 6.61 \pm 4.22$.

Uit dit betrekkelijk groot aantal dieren, blijkt dat het verschil in G.V. wel grooter is dan zijn middelbare fout, maar niet driemaal. Hier mogen we dus geen verschil aannemen.

8. Met de samenstelling 0.200 gr. ol. cacao en 0.0075 gr. melkzuur. De lengte van deze bacilla was 1.56 c.M. en de dikte 4 m.M. De p_H na de behandeling was meestal ± 4.2 .

Tabel 8.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling		Aanduiding ram
	♂	♀	♂	♀	
K 1	—	—	1	6	975
K 3	5	3	4	2	"
K 5	3	3	2	5	"
K 7	4	1	3	1	"
K 8	—	—	6	—	"
K 9	3	2	1	7	"
983	4	—	6	1	970
980	9	3	2	4	"
984	4	1	5	—	"
981	1	4	1	8	"
R 4	—	—	4	—	„de bruine”
R 2	5	3	1	6	"
R 5	—	—	—	4	"
R 6	—	—	2	2	"
Kre (haaskl.)	—	—	1	3	"
Kre (gele)	1	3	5	2	"
Kre 1	4	3	4	4	"
Kre 4	4	3	—	1	"
1000	2	1	5	2	979
989	4	7	1	4	"
971	6	3	2	6	"
997	—	5	3	3	"
999	1	8	2	5	"
988	1	7	3	2	"
W 1	3	1	—	—	De volgende steeds gewisseld van ram.
W 2	—	—	4	2	
W 3	4	3	—	—	
W 4	2	4	—	—	
W 5	3	1	—	—	
W 6	5	1	—	—	
W 8	2	3	—	—	
W 9	—	—	1	3	
W 10	2	3	—	—	
W 13	—	—	4	4	
W 14	—	—	3	4	
W 17	—	—	3	4	
D 2 e	—	—	4	2	
D 7	—	—	6	7	
D 10	—	—	1	3	
D 11	—	—	5	3	
D 15	—	—	—	4	
D 21	—	—	5	2	
D 23	—	—	1	3	
D 31	—	—	6	6	
D 32	—	—	1	1	
D 42	—	—	3	4	
D 43	—	—	3	1	
D 44	—	—	1	1	
D 45	—	—	3	1	
D 46	—	—	4	3	
D 47	—	—	3	2	
D 50	—	—	3	5	
	82	76	128	143	

G.V. zonder behandeling is 51.90 %.

G.V. met behandeling is 47.23 %.

m_1 is 4.02.

m_2 is 3.03.

G.V. $\text{diff.} \pm m_{\text{diff.}} = 4.67 \pm 5.03$.

Ook hier moeten we concluderen, dat de behandeling geen invloed op de geslachtsverhouding heeft uitgeoefend.

9. Bacilla van de samenstelling 0.5 gr. ol. cacao en 0.005 gr. melkzuur.

Tabel 9.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling		Aanduiding ram	
	♂	♀	♂	♀		
W 22	—	—	4	1	Steeds gewisseld van ram.	
W 24	—	—	5	1		
W 26	—	—	3	1		
W 28	—	—	3	1		
W 29	—	—	5	3		
W 35	—	—	2	2		
W 37	—	—	5	5		
D I	—	—	2	7		
D II	—	—	1	1		
D III	—	—	3	—		
D IV	—	—	2	7		
D VI	—	—	4	4		
D VII	—	—	4	5		
D VIII	—	—	2	1		
941	—	—	1	3		970
933	2	2	2	1		"
927	4	1	1	3		"
947	5	2	2	4		"
921	3	5	2	3	"	
	14	10	53	53		

G.V. zonder behandeling is 58.33 %.

G.V. met behandeling is 50.00 %.

m_1 is 10.06.

m_2 is 4.06.

G.V. $\text{diff.} \pm m_{\text{diff.}} = 8.33 \pm 11.17$.

Uit deze tabel zien we ook, dat het verschil van de G.V. niet $3 \times$ zoo groot is als zijn middelbare fout.

10. Suppositoria van de samenstelling 0.5 gr. ol. cacao en 0.050 gr. bic. natricus.

Tabel 10.

Aanduiding voedster	Zonder behandeling		Met behandeling		Aanduiding ram	
	♂	♀	♂	♀		
W 23	—	—	5	3	Niet steeds denzelfden ram.	
W 25	—	—	2	—		
W 27	—	—	2	3		
W 30	—	—	4	2		
W 31	—	—	3	1		
W 32	—	—	8	1		
W 33	—	—	5	3		
W 34	—	—	3	1		
W 36	—	—	4	2		
Kr 25	4	1	7	3		Kr. 20
Kr 26	3	2	4	5		"
Kr 27	—	2	1	7		"
Kr 30	5	1	—	4		"
Kr 32	2	3	5	—		"
921	3	2	2	1	970	
923	—	—	1	3	"	
927	4	1	4	—	"	
933	2	2	2	9	"	
941	—	—	—	6	"	
	23	14	62	54		

G.V. zonder behandeling is 62.16 %.

G.V. met behandeling is 53.45 %.

m_1 is 7.97.

m_2 is 4.63.

$G.V._{diff.} \pm m_{diff.} = 8.71 \pm 9.22.$

Uit het bovenstaande blijkt, dat ook hier geen aantoonbaar verschil in de G.V. bestaat.

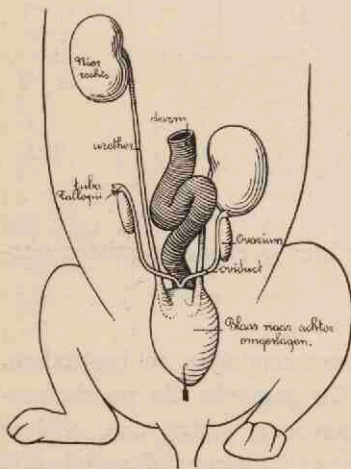
Alvorens de resultaten van deze waarnemingen te bespreken, moeten eerst enkele opmerkingen worden gemaakt. Bij voorbehandelde dieren, hetzij met bicarbonas natricus, hetzij met acidum lacticum, werden meer steriele dekkingen gezien, dan bij niet behandelde.

Een enkele maal lieten we de voedster een week na de partus weer copuleeren, met een gunstig resultaat. De p_H van de vagina van deze dieren week niet af van die der andere. De draagtijden van de dieren waren 28—32 dagen, meestal 30 dagen.

Negen voedsters, die niet in de bronstperiode waren, lieten we zonder behandeling gedwongen copuleeren. Vier van deze dieren bleken bevrucht te zijn.

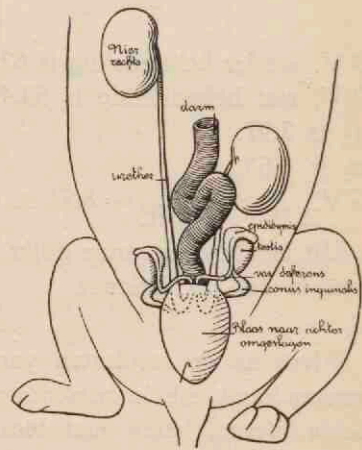
Bij het konijn wordt de ovulatie door de copulatie opgewekt. De eitjes verlaten 8 tot 10 uur nadien het ovarium. (Zie hoofdstuk kathaphorese).

Het geslacht van de vruchten konden we niet direct na de partus aan de uitwendige genitaliën vaststellen. Het gelukte ons eerst drie weken na de geboorte bij de levende dieren met zekerheid het geslacht te bepalen. Dikwijls werden de pasgeboren dieren direct gedood. Zoowel op deze als op de doodgeborenen werd dan sectie verricht. In twijfelgevallen werden de geslachtsorganen microscopisch onderzocht. Indien men echter de genitaalorganen bij de obductie goed beziet, zoo noodig met een loupe, is het na eenige ervaring gemakkelijk, als men met de situatie ter plaatse op de hoogte is, macroscopisch de beide geslachten uit elkaar te houden. Daar het in het begin wel moeilijkheden oplevert, lijkt het ons zeer gewenscht een korte beschrijving te laten volgen van de vorm en ligging der genitaliën van deze pasgeboren dieren (hoogstens 12 uur oud). Zie figuur 2 en 3.



Urogenitaalstelsel konijn ♂

Fig. 2



Urogenitaalstelsel konijn ♀

Fig. 3

Als we de buikholte van het op de rug liggende dier in de mediaanlijn openen, is het eerste wat we zien de meestal uitgezette vesica urinaria met de beide A^a umbilicales; ook de veelal met melk gevulde maag valt direct in het oog. We doen vervolgens het beste de blaas los te maken en naar achteren, het convoluut darmen naar voren en ter zijde, om te slaan. We zien het rectum in de mediaan-

lijn loopen en rechts en links in de lendenstreek de nieren liggen, de rechter meer naar voren dan de linker.

Bij het vrouwelijke dier doen zich de ovaria als in de lengte gelegen, ovale, grijsachtige, glanzende organen voor, die zich achter de nieren bevinden. De lengte van deze lichaampjes varieert van 3.5—4 m.M. en de breedte van 2.5—3 m.M.. Het linker ovarium ligt meestal vlak tegen de achterrand van de linker nier aan, het rechter ligt meer craniaal en bereikt de rechter nier niet. Het oviduct loopt verschillend, bij het eene dier mediaal en bij het andere meer lateraal en soms bij het zelfde dier het eene mediaal en het andere lateraal van het ovarium. Er zal derhalve misschien in de loop der ontwikkeling, evenals bij de testikels, een draaiing plaats vinden van de eierstok van mediaal naar lateraal, die bij verscheidene dieren bij de geboorte nog niet heeft plaats gevonden.

Bij de mannelijke dieren vinden we een andere situatie. Hier liggen de testikels intra-abdominaal en veel meer caudaal dan de ovaria. De linker testis bereikt nooit de linker nier. De descensus testicularum (bij het volwassen dier ook zeer onvolkomen en periodisch) heeft niet plaats gehad. De testikels vertoonen zich min of meer als ovale lichaampjes, die proximaal van een kapvormige verdikking, het caput epididymidis, voorzien zijn. De gemiddelde lengte van de testis is 4.5 m.M. en de breedte 4 m.M.. Lateraal of mediaal van de testikel loopt dicht tegen de testis aan het corpus, overgaande in de cauda epididymidis. We vinden geen constant verloop en ligging van de bijbal ten opzichte van de testikel. Volgens van Vloten maken de testikels van het rund in hun ontwikkeling een kanteling om hun lengte-as in buitenwaartsche richting. Dit zal ook het geval zijn bij de konijnen-fetus. Derhalve kan de ligging van den bijbal ten opzichte van den testis verschillend zijn.

Vervolgens valt direct in het oog, dat het caudale deel van de epididymis verbonden is met een strengvormige verdikking, die als een kegel in de buikholte naar voren springt, uit de buikwand in de buurt van de lies komende en door Klatsch is aangeduid als conus inguinalis. Deze vorming blijkt te bestaan uit een bindweefsel-laag en twee in verschillende richting verloopende lagen van dwars-gestreepte spiervezelen, die afkomstig zijn van de muscoli obliquus abdominus internus en transversus. Aan de top van die kegel zit het korte ligamentum inguinale met zijn gladde spiervezelen en het zeer kleine ligamentum testis vast. De musculeuze conus, die een

grootte rol speelt bij de descensus testicularum, is bij deze pasgeborene zeer sterk ontwikkeld.

Gaan we thans de uitkomsten van de onderzoeken na, dan moet er eerst op worden gewezen, dat geen der nakomelingen eenig nadeel van de behandeling der moederdieren heeft ondervonden. Geen der dieren was lichamelijk minderwaardig en kiembeschadiging heeft dus niet plaatsgevonden.

De resultaten van de onderzoeken van alle dieren tezamen met bic. natric, en melkzuur behandeld, zijn de volgende:

Zonder behandeling verkregen we 338 mannelijke en 335 vrouwelijke vruchten of 50.22 % mannelijke en 49.78 % vrouwelijke. De G.V. met zijn middelbare fout is 50.22 ± 1.93 .

Met bic. natricus behandeld verkregen we 377 mannelijke (51.36 %) en 357 vrouwelijke (48.64 %) dieren, G.V. met m.f. is 51.36 ± 1.84 . Het verschil met zijn middelbare fout is 1.14 ± 2.67 .

Het aantal vruchten na melkzuurbehandeling bedraagt 213 mannelijke (46.81 %) en 242 vrouwelijke (53.19 %). G.V. met m.f. is 46.81 ± 2.34 .

G.V. $\text{diff.} \pm m \text{ diff.} = 3.41 \pm 3.03$.

Hoewel het oppervlakkig lijkt, alsof de behandeling verschuivingen deed ontstaan, leert de berekening echter, dat hier geen verschil mag worden aangenomen.

Deze samenvatting van alle tabellen betreffende de konijnen, heeft slechts een betrekkelijke waarde, omdat de verschillende groepen niet op dezelfde wijze zijn behandeld, daar de concentraties van de bic. natricus en melkzuur telkens varieerden.

Het resultaat van bovengenoemde reeks onderzoeken, die we met konijnen hebben verricht in de loop van de laatste twee jaren hebben tot de volgende conclusies geleid.

We trachtten door verschillende concentraties NaHCO_3 en acidum lacticum de pH van de vagina vóór de cohabitatie te veranderen. Uit de genoemde tabellen blijkt echter, dat we voor de theorie van *Unterberger* geen bevestiging konden vinden.

Een geslachtsverschuiving is niet aan te toonen. Onze proeven hebben bovendien duidelijk laten zien, dat een behandeling zelfs met zeer geringe concentraties, zoowel van de zure als de basische stof, een nadeelige invloed kunnen uitoefenen op het resultaat der copulatie. Herhaalde malen bleven voedsters na de behandeling steriel. De fokkers, die ons bij deze proeven materiaal verschaften,

merkten dit al spoedig; dat zij niettemin volgens onze aanwijzingen de experimenten voortgezet hebben, mogen we hier nog wel met een extra woord van dank vermelden.

Schumacher en Günther zijn tot overeenkomstige resultaten gekomen. We lazen hiervan de volgende resultaten.

Ram A. met tien voedsters, behandeld met NaHCO_3 : 33 ♂ en 36 ♀,
behandeld met acid. lacticum: 36 ♂ en 25 ♀.

Ram B. met tien voedsters na NaHCO_3 behandeling: 22 ♂ en 18 ♀,
na behandeling met melkzuur: 24 ♂ en 36 ♀.

Ram C. na behandeling van 10 voedsters met NaHCO_3 : 26 ♂ en
11 ♀, en na behandeling met melkzuur: 18 ♂ en 17 ♀.

Zonder behandeling: 8 ♂ en 14 ♀.

In bovenstaande serie onderzoeken werd de p_{H} van de vagina vóór de copulatie naar de zure of alcalische zijde verschoven. Daarnaast zijn enkele proeven genomen, waarbij we eerst het sperma in een uitgesproken zuur of alcalisch milieu brachten en met deze suspensie een voedster kunstmatig insemineerden. De spermavloeistof verkregen we uit de beide epididymidis en ductus deferens van een pas gecastreerde ram, zoals in het hoofdstuk van de kathaphorese wordt beschreven. De inseminatie geschiedde enkele uren na de copulatie van de voedster door een steriele ram. De noodzakelijkheid hiervan wordt eveneens in het genoemde hoofdstuk vermeld. De resultaten van deze onderzoeken zijn in de volgende tabel weergegeven.

Tabel 11.

Tijd van de steriele copulatie	Tijd van de inseminatie	Aanduiding voedster	Milieu waarin het sperma werd gebracht	pH van de spermassuspensie	Verhouding der vruchten	
					♂	♀
9 uur 30	18 uur	917	glycocolbuffer met 2% glucose	8.11	3	2
9 uur 40	18 uur	918	glycocolbuffer met 2% glucose	8.11	2	2
8 uur	17 uur	996	phosphaat buffer met 0.5% glucose	7.98	1	5
10 uur	19 uur	950	glycocolbuffer met 1% glucose	4.41	3	4
10 uur	19 uur	916	glycocolbuffer met 1% glucose	4.41	niet bevrucht	
8 uur	18 uur	825	glycocolbuffer met 1% glucose	8.36	4	4

8 uur	18 uur	829	glycocolbuffer met 1% glucose	8.36	2	1
10 uur	19 uur	955	glycocolbuffer met 3% glucose	5.23	niet bevrucht	
10 uur	19 uur	957	glycocolbuffer met 3% glucose	5.23	niet bevrucht	
9 uur	17 uur	966	glycocolbuffer met 3% glucose	5.05	1	4
9 uur 30	17 uur	965	glycocolbuffer met 3% glucose	5.05	3	1

Uit deze tabel moeten we eveneens concludeeren, dat ook de behandeling van het sperma vóór de conceptie, geen invloed heeft op de geslachtsverhouding der vruchten.

Proeven met ratten.

Unterberger heeft zijn hypothese ook trachten te toetsen aan experimenten met ratten. Hij behandelde, in samenwerking met Kirsch, enkele witte ratten door poedering van de vagina met bicarbonas natricus. Alle dieren bleven echter steriel. De zuurgraad van het vaginaalslijm van deze dieren was normaal, neutraal, eveneens van het sperma. De onderzoekingen met deze dieren zijn niet voortgezet, evenmin die met muizen, daar volgens Unterberger en Kirsch de coïtus niet voldoende snel volgde op de inspuiting in de vagina en de zuurgraad dus inmiddels weer tot de normale teruggekeerd zou kunnen zijn.

Wij hebben vele ratten op verschillende wijzen behandeld vóór de coïtus. Ook wij hadden last dat verschillende dieren steriel bleven, maar uit de tabel blijkt wel, dat dit lang niet met alle het geval was.

De mannelijke dieren werden ieder afzonderlijk gehouden; de vrouwelijke werden na de behandeling direct in de cel van den man gezet en niet omgekeerd, daar de laatste zich in een nieuwe omgeving niet thuis gevoelt, zich eerst moet oriënteren en dan in het begin geen interesse heeft voor het vrouwelijke dier. De experimenten gelukten het beste in een warme, donkere omgeving. Heel slecht geschieden ze overdag en bij een lage temperatuur (ratten zijn nachtdieren).

We moesten ons er steeds van overtuigen, dat de coïtus direct

na de behandeling plaats had. Deze proeven namen veel tijd in beslag, daar de dieren iedere dag werden behandeld. Bij de ratten treedt in den regel, evenals bij de konijnen, ovulatie op, indien coïtus plaats vindt, terwijl de bronst toch een regelmatig verloop heeft.

De draagtijd van de ratten is 21—22 dagen. De p_{H} van de vagina bleek, met de indicatoren-papiertjes bepaald, gemiddeld 7.2 te zijn, die van het sperma 7—7.4.

De behandeling geschiedde op twee manieren.

a. door het brengen van suppositoria in de vagina direct vóór de copulatie, bestaande uit oleum cacao met acidum lactium of NaHCO_3 .

b. injecties in de vagina met een oplossing van de bovengenoemde stoffen.

Als de copulatie niet direct geschiedde na de behandeling, werd het vrouwelijke dier onmiddellijk uit de cel verwijderd en indien bronstig, opnieuw behandeld.

Na de partus werden de pasgeboren dieren meestal direct gedood, daar uitwendige geslachtsonderkenning eerst na eenigen tijd mogelijk is. Bij de ratten vinden we de omstandigheid, dat de urethra niet in de vagina uitmondt. Er bestaat een volkomen scheiding tusschen deze beide deelen. Dit verschijnsel wordt in vele boeken niet vermeld. Een duidelijke uiteenzetting over de ontogenie vonden we van de hand van M i s b e r g. Bij de ratten treedt er een volkomen afsnoering op tusschen de aanleg van de vagina en het deel van de sinus urogenitalis, dat urethra heet. Deze scheiding is pas volkomen vijf dagen na de geboorte.

Bij de sectie bleek de geslachtsbepaling gemakkelijk te zijn. Bij de mannelijke dieren vinden we nl. direct naast de blaas, in verhouding met de andere organen zeer groote vormsels, de testikels, met een zeer duidelijke kapvormige epididymidis voorzien. De ovaria zijn minder goed waar te nemen en liggen meer oraal in de buurt van de nieren.

De suppositoria bestonden uit 5 m.gr. melkzuur en 133 m.gr. oleum cacao. De basische uit 125 m.gr. NaHCO_3 en 120 m.gr. oleum cacao. De injectievloeistoffen waren 0.5 % bicarbonas natrius en 0.075 % acidum lacticum.

De resultaten zijn in de volgende tabel weergegeven.

Tabel 12.

Fokkooi	Mannetje	Vrouwte	Behandeld.					
			Onbehandeld		Suppos.bevat- tende acidum lacticuc		Suppos.bevat- tende bicarbo- nas natricus	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
III	linker oormerk	Witte XII	4	5	3	2	2	5
IV	IV	Bonte III	2	—	3	1	5	1
V	V	Witte in O	5	3	2	—	2	6
VIII	V	Bonte XVI	3	2	4	1	3	7
VIII	niet ge- merkt	Witte XIV	4	7	—	1	3	3
IX	rechter- oogmerk	Bonte VIII	2	2	3	5	1	6
IX	rechter- oogmerk	Witte XV	4	5	4	—	3	5
X	twee ooren gemerkt	Bonte IX	2	5	5	4	4	4
X	twee ooren gemerkt	Bonte XVII	2	3	3	3	3	2
XI	XI	Bonte X	5	4	7	3	1	4
O	steeds dezelfde	Bonte XX	5	—	2	1	4	4
"	"	1	1	7	2	5	—	—
"	"	2	3	2	3	2	5	2
"	"	3	4	3	2	2	3	1
"	"	4	5	2	4	1	2	7
"	"	5	5	4	1	5	2	2
"	"	6	6	3	3	2	6	—
"	"	7	4	2	1	1	1	4
"	"	8	1	4	4	2	2	6
"	"	9	2	3	1	3	4	2
"	"	10	?	?	5	2	3	5
			69	66	62	46	59	76

G.V. van de onbehandelde dieren is 51.11 %.

G.V. van de dieren behandeld met de suppositoria van melkzuur voorzien is 57.41 %.

G.V. van de met de basische nootjes behandelde dieren 43.70 %.

m_1 onbehandeld, is 4.30.

m_2 met melkzuur behandeld, is 4.76.

G.V. diff. $\pm m_2$ diff. = 6.30 ± 6.41 .

m_3 met NaHCO_3 behandeld, is 4.27.

G.V. diff. $\pm m_3$ diff. = 7.41 ± 6.06 .

Zonder berekening der middelbare fout zou men hier kunnen gaan denken aan verschillen in de geslachtsverhouding tengevolge

van de behandeling. De fouten-rekening toont echter aan, dat deze verschillen niet wiskundig bevestigd zijn en we hier dus geen verschuiving van de G.V. door de behandeling mogen aannemen.

We behandelden 10 ratten met een 0.5 % NaHCO_3 oplossing en 12 met 0.075 % melkzuur oplossing. De copulatie geschiedde door twee mannelijke ratten. Het resultaat van de basische behandeling was 28 mannelijke en 40 vrouwelijke ratten.

G.V. van deze dieren was 41.18 %.

m_1 onbehandelde dieren is 4.30.

m_2 met NaHCO_3 behandelde dieren is 5.97.

G.V. diff. $\pm m$ diff. = 9.93 ± 7.36 .

Het resultaat van de zure behandeling was 36 mannelijke dieren en 27 vrouwelijke.

G.V. van deze dieren is 57.14 %.

m_1 onbehandelde dieren is 4.30.

m_3 met zuur behandelde is 6.23.

G.V. diff. $\pm m$ diff. = 6.03 ± 7.58 .

Ook uit deze getallen blijkt het, dat er geen sprake is van een geslachtsverschuiving.

Gaan we ten slotte de verschillen na van alle dieren behandeld met melkzuur, bicarbonas natricus en de onbehandelde, dan kunnen we het volgende opmerken.

Zonder behandeling kregen we de volgende verhouding van de vruchten:

69 δ en 66 φ of 51.11 % δ en 48.89 % φ .

De G.V. met zijn middelbare fout is 51.11 ± 4.53 .

Met de alcalibehandeling verkregen we het volgende aantal vruchten:

87 δ en 116 φ of 42.86 % δ en 57.14 % φ .

G.V. diff. $\pm m$ diff. = 8.25 ± 5.71 .

Na de melkzuurbehandeling kwamen we tot het volgende aantal: 98 δ en 73 φ of 57.31 % δ en 42.69 % φ .

Het verschil met zijn middelbare fout is 6.20 ± 5.90 .

Ook uit deze getallen volgt de conclusie, dat hier geen sprake is van eenig aantoonbaar verschil.

Agnes Blum heeft met muizen verschillende proeven gedaan door ante cohabitationem in de vagina en in de uterus een 0.25 % oplossing van NaHCO_3 te injecteren. Door de contracties van de uterus was het haar slechts mogelijk in één hoorn de vloeistof te spuiten. De resultaten heeft ze ons per brief medegedeeld. Ze verkreeg na de behandeling een lichte verschuiving van de geslachten naar de vrouwelijke kant; dus in een richting tegengesteld aan die van Unterberger. A. Blum vond n.l. na de behandeling de verhouding 45.25 % mannelijke en 54.75 % vrouwelijke vruchten. Het verschil was 4.65 ± 1.33 . Dit verschil is statistisch bevestigd. Deze onderzoekster trekt de conclusie: „Dass ein „bestimmtes Alkali-gehalt des Scheidensekretes die Beweglichkeit „der männchen bestimmenden bzw. weibchen bestimmenden Spermien beeinflusst (fördert) und damit das Geschlechtsverhältnis „entscheidet. Es muss wohl für jede Spezies die Dosis ausprobiert „werden.“

Zooals uit onze getallen blijkt, verkregen ook wij een verschuiving van de G.V. met alcali naar de vrouwelijke kant, maar deze kan niet mathematisch bevestigd worden.

Proeven met schapen.

Door een toevallige omstandigheid waren we in staat eenige schapen voor onze proeven te verkrijgen. Zodoende werden 17 schapen door ons behandeld met een 0.5 % NaHCO_3 oplossing vóór de cohabitatie. We lieten de paring toe na tien minuten. Van deze 17 dieren werden 11 drachtig. We gebruikten steeds denzelfden ram. De contrôledekkingen zonder behandeling hadden het vorige jaar plaats gehad, maar met een anderen ram.

De p_{H} van de vagina werd bij 5 schapen bepaald met behulp van de eenvoudige colorimetrische methode door middel van de indicatorenpapiertjes. De p_{H} lag in de buurt van 7.2 — 7.1 — 7.4 — 7.2 — 7.0. Het resultaat van de onderzoekingen is in onderstaande tabel neergelegd.

Tabel 13.

Aanduiding moeder-dier	Zonder behandeling		Met behandeling	
	♂	♀	♂	♀
S 1	1	1	—	2
S 2	2	—	1	2
S 3	—	3	3	—
S 5	1	2	1	1
S 5	—	1	3	—
S 8	—	2	2	—
S 9	2	1	—	3
S 11	1	1	—	2
S 14	2	—	3	—
S 15	1	1	1	1
S 17	—	—	—	3
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	10	12	14	14

G.V. zonder behandeling is 45.45 %.

G.V. met behandeling is 50.00 %.

m_1 is 10.62.

m_2 is 9.45.

G.V. diff. $\pm m$ diff. = 4.55 ± 14.21 .

De berekening laat heel duidelijk zien, dat de behandeling geen invloed heeft gehad op de geslachtsverhouding.

Proeven met varkens.

Negen varkens werden vóór de copulatie behandeld, door in de vagina een oplossing van ± 60 cc. 0.5 % bicarbonas natricus te brengen met behulp van een slang en trechter. Van deze dieren werden 6 drachtig na de behandeling. Voor de normale geslachtsverhouding van varkens verwijzen we naar de opgaven in de literatuur aangegeven. Cole heeft ook enkele proeven met deze dieren genomen om de invloed van de p_H op de G.V. na te gaan. De door hem gevonden cijfers laten we hieronder ook volgen.

Tabel 14.

Aantal door ons behandeld.	Manier van behandeling.	Aantal dieren dat bevrucht werd.	Verhouding der vruchten.	
			♂	♀
9	Infusie van 60 cc. 0.5% NaHCO ₃	6	27	24
Aantal door Cole behandeld				
32	Infusie van 50 cc. 0.5% NaHCO ₃	19	83	87
Aantal onbehandeld door Cole		36	141	148
Aantal onbehandeld door: Zeller, McPhee, Russell		?	11883	10819

G.V. van de door ons behandelde dieren is 52.94 %.

G.V. van de door Cole behandelde dieren is 48.82 %.

G.V. van de onbehandelde dieren volgens Cole is 48.79 %.

G.V. van de onbehandelde dieren volgens McPhee e.a. is 52.32 %.

m van de door ons behandelde dieren is 6.99.

m van de onbehandelde dieren, volgens McPhee is 0.33.

G.V. diff. $\pm m$ diff. = 0.62 ± 7.00 .

De resultaten van de behandeling zijn vergeleken met de geslachtsverhouding uit een groot materiaal (22702 dieren) verzameld door McPhee, aangezien wij niet beschikken over zelf verzamelde cijfers. Uit het bovenstaande is de conclusie alleszins gewettigd, dat de behandeling geen invloed op de G.V. heeft uitgeoefend.

Proeven met runderen.

Unterberger was van inzicht, dat de dieren, die slechts één jong ter wereld brengen in de eerste plaats voor dierexperimenten in aanmerking komen. De knaagdieren, die gelijktijdig meerdere jongen werpen, waren minder geschikt, daar bij deze dieren volgens hem de copulatie en ovulatie van alle eitjes niet op hetzelfde oogenblik plaats vinden. Unterberger is derhalve, in samenwerking met Kirsch, zooals deze ons schriftelijk mededeelde, overgegaan tot het nemen van onderzoekingen bij runderen; de resultaten hiervan zijn ons echter tot heden nog niet medegedeeld.

Voordat wij er toe overgingen proeven met deze dieren te nemen, trachtten we eerst de normale zuurgraad in de vagina der koeien te leeren kennen.

Zooals bekend is, is de eenige juiste manier om de reactie van een oplossing aan te duiden, de opgave van het aantal waterstofionen per Liter. Deze waarde noemt men de actueele reactie, de reeële aciditeit van die solutie. Deze is wel te onderscheiden van de potentieele aciditeit, de potentieele- of titrimetrische reactie. Deze laatste wordt aangegeven door de hoeveelheid base of zuur, welke de oplossing kan binden. Bij de bestudeering van de reactie der vaginainhoud, was het voor ons van het grootste belang, de actueele reactie hiervan te leeren kennen, want, mocht de theorie van *U n t e r b e r g e r* juist zijn, dan is het in de eerste plaats deze reactie en niet de titrimetrische, die van groote invloed is op de beweging van de spermatozoïden. Immers men bepaalt door de titratie de zgn. totaal aciditeit en niet de hoeveelheid vrij zuur (of H-ionen-concentratie).

In tegenstelling met de veterinaire literatuur, bevat de medische vele artikelen over de aciditeit in de vagina van de mensch. Vooral in verband met de bij het rund gevonden waarden, lijkt het ons zeer gewenscht hier in het kort iets over mede te deelen.

Het is reeds lang bekend, dat de vagina van de vrouw onder normale, physiologische verhoudingen over het algemeen zuur reageert. (*D ö d e r l e i n*, *J a s c k e*, *K e s s l e r*, *R ö h r s*, *D e m m e*, *B a l t z e r*, *Z w e i f e l*, *W i r z*). Het slijm bevat verschillende soorten bacteriën, waarvan de *Döderleinsche* bacil een groote rol speelt. De zure reactie is te danken aan de hoeveelheid gevormde melkzuur. Hieraan wordt een groote beteekenis toegeschreven als beschutting tegenover vele infecties. In de medische literatuur vinden we verder een verdeling van de verschillende zuurgraden, al naar de aanwezige bacteriën-flora. (*S c h r ö d e r*, *L ö s e r*, *B e h r e n s*, *N a u j o k s*). Zoo wordt bij een bepaald bacterie-gehalte een bepaalde p_H gevonden van het vaginaal-secretum. De verdeling heeft plaats gehad in „Reinheitsgraden”, al naar aanwezigheid van staafvormige vaginaalbacillen, diplococcen, staphylococcen of streptococcen. Over de indeeling van deze graden bestaat in de literatuur geen volledige overeenstemming. De indeeling van *S c h r ö d e r* luidt als volgt:

„Reinheitsgrad I”: verschillende vaginaalbacillen p_H : 3.86—4.45.

„Reinheitsgrad II”: vaginaalbacillen en diplococcen p_H : 4.6—5.34.

„Reinheitsgrad III”: geen staafvormige vaginaalbacillen, wel vele coccen, vooral streptococcen p_{H} : 4.9—6.04.

Het normale vaginaalslijm met een normale flora heeft meestal een p_{H} schommelende tusschen 3.8—4.4. Indien er leucocyten in het secretum aanwezig zijn stijgt de p_{H} . Het cervicaalslijm daarentegen heeft bij de vrouw een veel hogere p_{H} , tusschen 7.2—9.0 (Wirz). Geen eenstemmigheid heerscht er bij de verschillende onderzoekers over het veranderen van de zuurgraad tijdens de cyclische schommelingen van hetzelfde individu. Volgens Gräfenberg is er zeer zeker een groot verschil in de totale hoeveelheid zuur op verschillende tijden bij dezelfde persoon. Behrens en Naujoks vinden geen verschil in de zuurgraad, terwijl andere als Demme en Baltzer wel een verschil kunnen aanwijzen. Enkele gynaekologen (Füth, Wirz) hebben verder aangetoond dat het organisme, in het verloop van de zwangerschap, de aanwezige vaginale reactie over het algemeen behoudt.

Wat de zuurgraad van de vagina der runderen betreft, wist men reeds langen tijd, dat deze alcalisch was. Een nadere studie echter omtrent de juiste p_{H} , heeft voor zoover wij in de literatuur hebben kunnen nagaan, nog niet plaats gehad.

Gelijk bekend is, was men vroeger vooral de meening toegedaan, dat de steriliteit der runderen veelal was toe te schrijven aan een verhooging van het zuurgehalte der vagina (Grabensee, Schünhoff, König e.a.). Het gevolg hiervan was, dat de vagina van deze dieren vóór de coïtus geïrrigeerd werd met een 0.5 % NaHCO_3 oplossing om de zure reactie te neutraliseeren. Deze medicamenteuse behandeling wordt heden ten dage nog veel toegepast, maar naar het inzicht van Wester heeft deze echter alleen waarde om de aanwezige spermatoxische stoffen te verwijderen. Verdere mededeelingen over de aciditeit van de vagina der runderen zijn verschenen van de hand van Renkert, Reinhardt, Grabensee, Wester, Zschokke, Find en Posselt. Al deze onderzoekers hebben ervaren, dat er in het meerendeel der gevallen een alcalische reactie in de vagina der runderen heerschte; slechts zeer zelden kon een zuur slijm worden aangetoond. In deze publicaties zochten we veelal vergeefs naar de wijze waarop de reactie was bepaald. Alleen Wester en Renkert gaven aan, dat dit was geschied met behulp van lakmoespapier. Een zuiver chemisch onderzoek naar de werkelijke zuurgraad is door geen der onderzoekers medegedeeld. Dat de

zuurgraadbepaling van een slijmige vloeistof door middel van lakmoespapier een ideale methode is, zal wel door niemand, die er mede gewerkt heeft, worden beweerd. Het neutrale punt van lakmoes kan namelijk niet juist worden aangegeven, maar schommelt tusschen ± 6.5 — 7.5 . Niet zelden kan men een lichte blauwe verkleuring van rood lakmoespapier waarnemen bij p_H 6.5 — 7.0 , dus bij waarden, die exact physisch-chemisch bepaald, zeer zeker in het bereik van de zure reactie liggen. Daarbij komt nog de vaak moeilijk te onderscheiden kleuromslag van blauw-rood bij lichte aanzuring of alcaliseering, zoodat de waarden niet absoluut objectief zijn te bepalen.

K a d e n heeft getracht de potentieele aciditeit van het vaginaal-slijm vast te stellen, op dezelfde wijze als door G r ä f e n b e r g bij de mensch was geschied. Te dien einde verdunde hij het verkregen slijm 1:20 met gedestilleerd water, mengde dit goed en ging het daarna filtreren. Aan het filtraat voegde hij 2 cc. 1 % alcoholische phenolphthaleïne oplossing toe en titreerde met $\frac{1}{100}n$ NaOH. De zuurgraad was dan volgens hem het aantal cc^3 . $\frac{1}{100}n$ loog, dat noodig was om 20 cc. filtraat te neutraliseeren. Het resultaat van deze onderzoekingen luidde, dat hij slechts zelden een zure reactie kon aantoonen. De waarden van de gevonden zure monsters schommelden tusschen 0.1—0.8 en van de alcalische tusschen -0.06 tot -0.8, gemiddeld -0.39.

Voor onze onderzoekingen was het echter van belang de H-ionenconcentratie te kennen en niet de in totaal aanwezige, vervangbare waterstof. Derhalve moesten we ons eerst bezig houden een geschikte methode te vinden om deze te kunnen bepalen. Daar we de normale p_H van de vagina wenschten te weten, voordat wij de dieren behandelden, onderzochten we de p_H bij het begin van deze proeven, in de bronstperiode, die zich kenmerkt door het afscheiden van een groote hoeveelheid secretum.

We trachtten in de eerste plaats met behulp van de indicatorenmethode de H-ionenconcentratie van de vagina te bepalen. Voordeelen van deze methode zijn: er zijn geen kostbare instrumenten noodig, is gemakkelijk en snel toe te passen en de p_H kan direct in de vagina van het rund bepaald worden. Te dien einde gebruikten we indicatorenpapiertjes van filtreerpapier, gedrenkt in oplossingen van verscheidene indicatoren als door C l a r k en L u b s zijn aangegeven (broomthymolblauw, phenolrood, enz. zie vroeger) en brachten deze met behulp van een ronde eboniëten of glazen staaf,

waaraan de papiertjes met zilveren ringen waren bevestigd, eenige tijd in de vagina. De zoo ontstane kleur werd daarna vergeleken met een kleurschaal, behoorende bij die indicator, gemaakt van een oplossing waarvan de p_{H} bekend was. Deze wijze van werken bleek voor ons doel niet geschikt te zijn, daar de indicatorpapier-tjes, die vaak geheel verweekt en stuk uit de vagina kwamen, zeer onduidelijke kleurveranderingen vertoonden, die niet goed met de kleurindex vergeleken konden worden. De verkregen tint was niet overal dezelfde en we wisten niet welke we als de juiste moesten aannemen.

Met de foliën-kolorimeter volgens W u l f f gelukte het ons evenmin de juiste p_{H} van het secretum vast te stellen. De indicator-folie-methode berust op hetzelfde principe als de vorige, maar in plaats van met filtreerpapier wordt hier met gelatineuse membraantjes gewerkt, waarin een indicator is geadsorbeerd. Deze membraantjes geven wel goed de p_{H} aan (op 0,2 nauwkeurig) van waterige oplossingen, maar niet van de zoo muceuse inhoud van de vagina, daar er geen goede diffusie van het secretieproduct plaats vond.

Een andere colorimetrische methode was, dat we het vaginaal-slijm direct gingen samenbrengen met de indicator. Daarvoor was het noodzakelijk, dat we het secretum zoo zuiver mogelijk uit de vagina verzamelden. Dit geschiedde op verschillende manieren. Na de vulva goed gereinigd te hebben, werd het slijm met behulp van een 45—50 c.M. lange, steriele, houten (uitgekookte) lepel met afgeronde randen, naar buiten gebracht. De lepel werd voordien eerst met physiologische keukenzout bevochtigd. Een andere manier was, dat we na het reinigen van de vulva, met een zoo goed mogelijk gewasschen hand en afgespoeld met physiologische NaCl oplossing of de rugzijde met een weinig paraffinum liquidum ingevet, het slijm uit de vagina verzamelden. Deze methode was veel praktischer dan de eerste, terwijl ons bij nader onderzoek bleek, dat de zuurgraad van het secretieproduct, dat op deze wijze verkregen werd, geen andere waarde had dan op de eerstgenoemde manier gewonnen.

Wanneer de koeien bronstig waren, gelukte het dikwijls het vele slijm door middel van rectale exploratie uit de vagina te laten vloeien.

Aan het zoo naar buitengebrachte te onderzoeken materiaal voegden we nu de oplossing van de indicator toe. De verkregen kleur wilden we vergelijken met die van bufferoplossingen met bekende

p_{H} , waaraan dezelfde indicator was toegevoegd. We stuitten hier echter op de onoverkomelijke moeilijkheid, dat de indicatoroplossing zich niet homogeen mengde met het slijm. De gekozen verhouding was 3 cc. slijm en 2 druppels indicator (0.03 % oplossing van thymolblauw, cresolrood enz.). Om een betere menging te verkrijgen gingen we de massa door middel van een geknopte roerstaaf schudden in een uitgestoomde glazen buis, onder paraffine. Dit laatste geschiedde om de gasuitwisseling tegen te gaan. Het gelukte ook op deze wijze niet, een gelijkmatige kleurintensiteit van het mengsel te verkrijgen en een nauwkeurige bepaling uit te voeren. Deze inhomogeniteit is misschien te verklaren door de selectieve adsorptie van de kleurstof aan het mucine-eiwit en het ontstaan van een kleurstofverbinding met een andere ionisatietoestand. We dachten deze ongelijke kleurintensiteit te kunnen opheffen door het slijm te verdunnen met uitgekookt gedestilleerd water en weer onder paraffine goed te schudden. Het bleek, dat de kleur nadien veel homogener was bij het toevoegen van een indicator, ofschoon op de eene plaats de kleurintensiteit nog wel hoger was dan op een andere. Maar het is de vraag of dit verdunde secretum dezelfde H-ionenconcentratie had als het onverdunde. Te dien einde bepaalden we de p_{H} van het onverdunde met de eenige goede methode, de glas-electrode (zie later) en vergeleken deze waarden met die, welke we verkregen van het verdunde door middel van de colorimetrische methode¹⁾. Hiervoor werden de indicatoren uit de reeks van Clark-Lubs gebruikt, die voor ons oog een duidelijker tint gaven dan die van Michaelis-Sørensen (dinitrophenol, p- en m-nitrophenol). Verschillende monsters zijn door ons vergeleken en eenige van de gevonden getallen in tabel 15 weergegeven.

¹⁾ Deze proeven zijn in het begin van het onderzoek verricht. Bij nadere beschouwing ware het beter geweest het verdunde- en onverdunde slijm beide met de glaselectrode te vergelijken.

Tabel 15.

Bijzonderheden van het slijm.	pH	
	Glaselectrode	Colorimetrisch
Dun, helder bronstsljm van een 5-jarige koe.	6.44	7.00 (1:5) *)
Dun, iets witachtig bronstsljm van een 4-jarige koe.	7.10	7.00 (1:10)
Dun, helder bronstsljm van een 5-jarige koe.	8.02	7.10 (1:5)
Zeer taai, helder slijm van een 3-jarige koe, niet in de bronstperiode.	7.86	7.00 (1:10)
Taai, helder slijm van een 3-jarige koe, niet in de bronstperiode.	6.66	7.60 (1:5)
Helder, taai slijm van een 8-jarige koe, niet in de bronstperiode.	7.98	7.40 (1:10)
Helder, dun bronstsljm van een 4-jarige koe.	7.76	7.40 (1:10)
Dun, helder bronstsljm van een 2-jarige koe.	7.43	6.80 (1:5)
		6.90 (1:10)
		7.50 (1:5)
		7.40 (1:10)
		7.00 (1:5)
		7.00 (1:10)
		7.10 (1:5)
		7.00 (1:10)

*) Achter de pH waarde is de verdunningsgraad aangegeven.

We mogen hieruit wel concludeeren, dat door de verdunning de p_H van het secretum een andere waarde heeft verkregen. Steeds was de verschuiving in meerdere of mindere mate naar de kant van het neutrale punt (7) toe. Verder kan worden opgemerkt, dat de minste verandering was ontstaan bij de monsters, die het taaiste waren. Dit is waarschijnlijk hierdoor te verklaren, dat bij dit secretieproduct het bufferend vermogen het sterkste is.

Daar met behulp van indicatoren de p_H van het vaginaalsecretum niet te bepalen was, zijn we er toe overgegaan potentiometrische methoden toe te passen.

Het eerst maakten we daartoe gebruik van de waterstof-electrode. Zooals bekend is, wordt hierbij het potentiaalverschil gezocht, dat een geplatineerde metaalelectrode aanneemt ten opzichte van de te onderzoeken vloeistof, welke verzadigd wordt gehouden met waterstofgas van één atmosfeer druk.

De bezwaren, die wij bij deze methode met het slijm ondervonden, hadden hun oorzaak in de eerste plaats hierin, dat de muceuse substantie zeer slecht met waterstof verzadigd kon worden. Door de wisselende aanraking slijm-electrode konden we geen verzadigingstoestand bereiken. Het compenseeren was derhalve onmogelijk en daardoor geen goede vaststelling van het potentiaalverschil te verkrijgen. Verder kon deze methode een bezwaar zijn voor onze

onderzoekingen, daar door het doorleiden van het waterstofgas, gassen als koolzuur, indien deze aanwezig mochten zijn, uitgedreven werden, waardoor de p_H ook zou veranderen.

Een zeer eenvoudige potentiometrische methode, die de laatste jaren veel gebruikt wordt, om de p_H te bepalen, is met de chinhydronelectrode. Chinhydron is een aequivalente moleculaire verbinding van chinon en hydrochinon. Deze bestanddeelen zijn in oplossing met elkaar in evenwicht.

$C_6H_4O_2 + H_2 \rightleftharpoons C_6H_4O_2H_2$. Een electrode gedompeld in een vloeistof, waaraan wat chinhydron wordt toegevoegd, heeft dan een bepaalde waterstofconcentratie en gedraagt zich als een waterstofelectrode. Hier wordt dus gemeten de oxydatie-reductie-potentiaal van het chinon-hydrochinonsysteem, aan een platina- of goud-electrode. Deze verandert op gelijke wijze met de p_H als een waterstofelectrode.

Wij werkten met een goudelectrode en een verzadigde kalomel als afleidelectrode. Aan het slijm werd een weinig chinhydron toegevoegd, wat zich slecht verdeelde in de muceuse massa. Uit de berekening (of aflezing) van de p_H bleek, dat we geen constante waarden kregen. Bij de eerste aflezing vonden we b.v. een waarde 7.38, na enkele minuten op dezelfde plaats 7.67 en na een kwartier 7.41. Bij een ander monster schommelden de getallen b.v. tusschen 7.40 en 6.71 op dezelfde plaats.

Deze electrode was derhalve voor ons materiaal onbruikbaar. Er zal geen goed dissociatie-evenwicht optreden; de verhouding chinon-hydrochinon zal niet constant blijven. Er zijn denkelijk in het slijm bestanddeelen aanwezig, die met het chinhydron in reactie treden en de afwijkingen doen ontstaan.

De tot dusver door ons toegepaste methoden bleken niet geschikt te zijn voor het onderzoek naar de p_H van het vaginaal-secretum, dat een min of meer taaie consistentie bezit.

Een bepalingsmethode, die wel tot het doel voerde, vonden we ten slotte in de glaselectrode, waarvan het gebruik de laatste jaren zeer op de voorgrond is getreden.

De vele bezwaren, die we met de vorige methoden hadden ondervonden, werden met deze electrode geheel opgeheven. De glaselectrode is op te vatten als een vat met een zeer dunne glaswand, waarin zich een vloeistof bevindt en geplaatst wordt in een ruimte waarin de te meten oplossing is gebracht. De binnenkant van het

dunne glasvliesje is in aanraking met een constante geleider en de buitenkant heeft de functie van electrode.

Nu is het reeds jaren bekend, dat zich tusschen twee vloeistoffen met verschillende waterstofionenconcentraties, die door een dunne glasmembraan zijn gescheiden, een potentiaalverschil instelt. Het potentiaalverschil, dat er bestaat tusschen de beide vloeistoffen is direct afhankelijk van de H-ionenconcentratie der beide oplossingen. Het is n.l. gebleken, dat indien het dunne, glazen vaatje in de vloeistof wordt geplaatst, waarvan men de p_H wenscht te weten, de H-ionen selectief door deze wand geadsorbeerd worden. Eveneens vormen de H-ionen van de vloeistof in het vaatje een dubbell laag met het glas. De glaselectrode gedraagt zich alsof ze een waterstofelectrode was. Men heeft dus de potentiaal sprong: uitwendige vloeistof (die men moet meten) — glas en glas — inwendige vloeistof (in het glazen vaatje gebracht).

Het bleek menig onderzoeker dat vele glassoorten voor het doel onbruikbaar waren. Bij verschillende soorten fungeerde de glasmembraan niet als een goede waterstofelectrode, daar de invloed op de elektrische potentiaal van andere in de oplossing aanwezige ionen niet was te verwaarloozen.

De toepassing in de praktijk van dit systeem bleef uit tot 1930 toen MacInnes en Malcolm Dole na vele proefnemingen een glassoort vervaardigden (Corning glass Nr. 015), waarmede een electrode werd gemaakt, die werkelijk als waterstofelectrode werkte. Deze electrode werd zoo vervaardigd, dat een heel dun vliesje van dit speciale glas onder een glazen buis werd gesmolten. De buis vulde men met 0.1 n HCl om een constant potentiaalverschil te houden en waarin een zilver-zilverchloride-electrode werd gedompeld als hulpelectrode. De vloeistof aan de andere zijde van het glas kan door een kalomelelectrode als hulpelectrode worden afgeleid. Hoe dunner het glasvliesje is, des te geringer is de weerstand, wat de meting ten goede komt. Verder biedt dit het voordeel, dat het potentiaalverval in het glas zelf, de asymmetrische potentiaal, die bij een dikkere wand grooter wordt, klein is.

Het groote bezwaar van de toepassing van deze electrode was tot voor korten tijd de meting van het potentiaalverschil tusschen de glaselectrode en kalomelelectrode. Nauwkeurige metingen waren enkele jaren geleden niet mogelijk, daar het optreden van een elektrische stroom met een galvanometer, zooals dit bij de andere methoden geschiedde, niet nauwkeurig waargenomen kon worden,

door een glaswand van een zeer hoge weerstand (meer dan 100 miljoen Ohm). De stroom in de keten, waarin ook de galvanometer is geplaatst, wordt n.l. bij gegeven potentiaalverschil steeds kleiner, naar mate de weerstand toeneemt.

De laatste tijd heeft men echter een andere methodiek toegepast om potentiaalverschillen nauwkeurig te meten in systemen met hoge weerstanden. Evenals in de radio-techniek maakt men te dien einde gebruik van speciale electrometerlampen met een zeer geringe roosterstroom (nul of zeer weinig hiervan afwijkende). Alleen wanneer de lamp aan de laatste voorwaarden voldoet, heeft het inschakelen van een zeer hoge weerstand geen invloed op het geconstateerde potentiaalverschil (zie de uiteenzettingen van J a n s s e n). De methode berust vervolgens hierop, dat de te meten spanning met een potentiometer gecompenseerd, ingesteld op het normaal-element, op het rooster van een triode wordt aangebracht. De roosterspanning van de electrometerlamp verandert niet, evenmin als de plaatstroom, met de galvanometer na te gaan, indien de compensatie goed is geschied.

Het is hier verder niet de plaats uitvoerig op deze methodiek in te gaan. In de literatuur zijn verschillende schema's gepubliceerd, welke men, evenals de groote voorzorgsmaatregelen ten opzichte van opstelling en afscherming (isolatie) kan bestudeeren. (E l e m a, J a n s s e n, S t a d i e, H a r r i s o n, F o s s b i n d e r, D u b o i s). Omtrent de bouw van de electrode verwijzen wij naar de publicaties van E l e m a, C r e m e r, H a b e r, K l e m e n z i e w i c z, J a n s s e n, M c I n n e s en D o l e.

De voorkeur van de glaselectrode boven de waterstof en de chinhydron ligt vooral hierin, dat men metingen in vloeistoffen kan verrichten die oxydeerende en reduceerende substanties bevatten en dat ook in vloeistoffen kan gemeten worden die CO_2 bevatten, zonder dat een bepaalde apparatuur noodig is. Het blijkt zodoende, dat deze methode zich bij uitstek leent voor p_{H} metingen in biologische substanties. De nauwkeurigheid is $0.02 p_{\text{H}}$ eenheden (1.2 m. Volt). Een zeer gunstige eigenschap is, dat men aan het te onderzoeken systeem niets hoeft toe te voegen, daar slechts het glasvliesje of het glazen bolletje (zie later) hierin wordt gedompeld. De bruikbaarheid ligt plus minus tusschen p_{H} 2—9.5. Bij p_{H} 9.5 wordt er nog slechts een fout van $0.02 p_{\text{H}}$ eenheden gevonden (E l e m a).

Verreweg de meeste metingen zijn door mij verricht in het

physiologisch-chemisch laboratorium van Dr. R. Brinkman te Groningen, met behulp van het glas-electrodetoestel, vervaardigd door „Cambridge Instrument Company Ltd. England”, voorzien van een zeer nauwkeurige electrometerlamp. Door de groote bereidwilligheid van Dr. Brinkman werd ik zoo in de gelegenheid gesteld te profiteeren van zijn vele ervaringen op het gebied van de zuurgraadbepalingen. Verder werden eenige metingen bij Dr. Ir. B. E. lema te Delft en bij Ir. W. Enklaar op het Hygiënisch laboratorium van Prof. L. K. Wolff verricht. Ik wil hier dan ook niet nalaten deze heeren nogmaals mijn dank te be-
tuigen.

Nadien werd op het laboratorium van Dr. Brinkman een toestel vervaardigd voor het Zoötechnisch Instituut te Utrecht, waarmede we de laatste onderzoeken hebben verricht.

Als electrode gebruikten we een zeer dun, uitgeblazen bolletje van het reeds genoemde Corningglas. Inwendig werd dit gevuld met 0.1 n HCl en verzadigd met chinhydron om constante waarden te verkrijgen. Uitwendig werd het bolletje geplaatst in het slijm, waarvan we het potentiaalverschil tegen de glaswand wenschten te kennen. Het slijm bevond zich in een steriel glaasje en werd verder afgeleid naar een kalomelelectrode, terwijl een in het bolletje geplaatste platina draad de andere pool van de cel vormde. Om voor een goede isolatie te zorgen werden de electroden op paraffine blokken opgesteld. Wat de berekening van de p_H betreft kunnen we het volgende mededeelen.

Daar er over het algemeen wordt aangenomen, dat de glas-electrode als een reversibele waterstofelectrode werkt, kan de electrodeformule van Nernst hierop worden toegepast in de volgende vorm:

$$p_{H^1} - p_{H^2} = \frac{RT}{F} (\pi_1 - \pi_2).$$

π stelt voor het waargenomen potentiaalverschil.

De te verwachten grootheid $\frac{RT}{F}$ (stel $1/a$) bij een waterstof-electrode is $\frac{1}{57.71}$ m. Volt bij 18° C.; bij 25° C. $\frac{1}{59.11}$ m. Volt.

De karakteristieke factor $\frac{RT}{F}$ verandert bij elke glaselectrode van dag tot dag iets en is voor verschillende electroden niet precies dezelfde. Derhalve werd zij iedere keer, voordat we tot een serie

metingen overgingen, bepaald aan de hand van enkele bekende buffers, die nauwkeurig met de waterstofelectrode en glaselectrode waren vastgesteld.

$$p_{H^1} - p_{H^2} = \frac{\pi_1 - \pi_2}{\alpha}$$

$$\alpha = \frac{\pi_1 - \pi_2}{p_{H^1} - p_{H^2}}$$

Wij gebruikten b.v. een K. biphtalaat buffer van p_H 4.01 en een borax buffer van p_H 9.20 bij 18° C.

p_H 4.10 gaf + 218 m. Volt.

p_H 9.20 gaf - 81 m. Volt.

Na toepassing van de formule van N e r n s t :

voor 5.19 p_H : 299 m. Volt.

voor 1 p_H : 57.61 m. Volt.

$\alpha = 57.61$ bij deze meting met deze glaselectrode.

Stel we vinden met het slijm + 6 m. Volt.

De p_H hiervan is dan $4.01 + \frac{+ 218 - 6}{57.61} \times 1 = 7.69$.

of $9.20 + \frac{- 81 - 6}{57.61} \times 1 = 7.69$.

De algemeene formule is $p_{H_x} = p_{H^1} + \frac{\pi_1 - \pi_x}{\alpha + (t - 18^\circ) \times 0.2}$

Met „t” wordt de temperatuur aangegeven.

De eenige, bruikbare methode om de p_H van het vaginaalsecretum der runderen te bepalen, bleek dus die met de glaselectrode te zijn. Het trof ons echter, dat verschillende medische onderzoekers de waterstofionenconcentratie van het vaginaalslijm van de vrouw vaststelden, door het slijm met aqua destillata te schudden, daarna te filtreren en van het filtraat colorimetrisch de zuurgraad te bepalen. Te dien einde brachten zij een gaasje in de vagina dat het slijm absorbeerde; dit werd na 12 uur weer verwijderd en uit de gewichtstoename de hoeveelheid slijm vastgesteld. De verdunningsgraad van het secretum was 1 : 10 (N a k a n o i n, M i u r a e.a.). Deze methode is door ons bij het slijm van vier runderen in de bronstperiode ook toegepast. We brachten een afgewogen, steriel gaasje in de vagina tot voor de cervix. Na vier uren werd dit verwijderd, gewogen, daarna met gedestilleerd water verdund

en gefiltree.rd We bepaalden de p_H van het onverdunde secretieproduct en van het filtraat met de glaselectrode. De volgende resultaten kunnen we hierover mededeelen.

Tabel 16.

Bijzonderheden van het rund	Eigenschappen van het secretum	pH onverdund secretum	pH verdund secretum
3 jaar, in goede voedingstoestand.	helder, dunvloeibaar.	6.57	6.67 (1:5) ¹⁾ 6.88 (1:10) ¹⁾
4 jaar, in matige voedingstoestand.	witachtig dunvloeibaar.	7.89	7.35 (1:5) 7.06 (1:10)
4 jaar, in matige voedingstoestand.	helder, dunvloeibaar.	6.98	7.09 (1:5) 6.95 (1:10)
4 jaar, in matige voedingstoestand.	helder, dunvloeibaar.	7.39	7.25 (1:5) 7.10 (1:10)

¹⁾ geeft de verdunningsgraad aan.

De H-ionenconcentraties van het onverdunde en het verdunde vaginaalslijm der runderen waren dus niet dezelfde. Voor ons had deze wijze van onderzoek dus geen waarde.

Verder werd nagegaan of het filtraat van het secretum, dat door ultrafiltratie werd verkregen, dezelfde zuurgraad had als het slijm zelf. Zoals men weet, wordt bij deze bewerking door overdruk de intermicellaire vloeistof uit een kolloïdale oplossing geperst. Daar het slijm als een organisch kolloïd wordt opgevat, zijn we dit procédé ook op dit materiaal gaan toepassen. We brachten 15 cc. van het secretieproduct, waarvan de p_H voordien was bepaald, boven een gehard filter dat door een poreuse plaat werd ondersteund, in een goed gesloten apparaat voor ultrafiltratie. Het filter bestond uit filtreerpapier, dat in een gelatineoplossing van bepaalde concentratie gedrenkt en in formaline gehard was. Het toestel werd daarna gesloten en een druk van drie atmosfeeren op de te filtereren stof uitgeoefend. Na plus minus vier uren werd een hoeveelheid van 5 à 8 cc. heldere vloeistof verkregen. De p_H van dit ultrafiltraat werd met de glaselectrode vastgesteld. Vijf monsters werden op deze wijze onderzocht en de resultaten in onderstaande tabel neergelegd.

Tabel 17.

pH vóór de ultrafiltratie	pH van het ultrafiltraat
7.10	7.79
7.23	7.45
6.89	7.33
7.66	7.41
7.83	8.08

Uit deze tabel blijkt, dat bij alle monsters verschillende resultaten werden verkregen en dat bij vier van de vijf bepalingen de p_{H} van het ultrafiltraat hooger en bij één, lager was dan van het bijbehorende secretieproduct.

Zoals reeds is medegedeeld, moest het slijm voor onze onderzoekingen uit de vagina worden genomen, daar de bepaling in het cavum vaginae met de electrometrische methode niet mogelijk was. Bij het verkrijgen van het materiaal werd natuurlijk de grootst mogelijke voorzichtigheid betracht. Het secretum werd direct na het naar buiten brengen in apart voor dat doel geblazen glazen buisjes verzameld en spoedig onderzocht. Mocht het langer dan drie uren duren, (wat slechts sporadisch het geval was) dan voegden we op aanraden van Dr. B r i n k m a n een druppel toluol toe, dat de bacteriewerking remde en de zuurgraad niet beïnvloedde. Het glaasje werd, indien de hoeveelheid slijm het toeliet, geheel gevuld om de aanwezigheid van een luchtlaag hierboven zooveel mogelijk te voorkomen. Het fleschje werd verder met een kurk, door staniol omgeven, afgesloten.

Daar bovendien de CO_2 -spanning van groote invloed kan zijn op de waterstofionenconcentratie, interesseerde het ons, welke koolzuurspanning er in de vagina van een koe heerschte. Daarvoor moesten we de lucht uit deze ruimte analyseren. Met behulp van een goed gesloten recordspuit, waarop een dikwandige slang was aangebracht, kon een weinig vaginaallucht worden opgezogen. De slang werd hierbij tot aan de cervix gebracht, terwijl de vulva werd afgesloten. Het bleek, dat het cavum vaginae zeer weinig lucht bevatte (± 12 cc.), daar de beide wanden zoo goed als tegen elkaar aan lagen. Voor de analyse werd gebruik gemaakt van het apparaat van H a l d a n e. De koolzuuresorptie geschiedt hierbij in 10 % KOH. Door middel van kwikdruk wordt de lucht hiermede in aanraking gebracht. Een nauwkeurige beschrijving van de techniek der gasanalyse vindt men in de meeste boeken over stofwisselingsbepalingen. De analyse leerde ons, dat het gehalte aan koolzuur 0.03 % was, dus niet afweek van de normale samenstelling der buitenlucht. De gasmonsters waren genomen van runderen, die in de weide liepen. Het vaginaalsecretum van deze dieren had een p_{H} van 7.38, 7.65 en 7.68.

Keeren we nu terug naar de p_{H} bepaling, dan merken we eerst nog op, dat het slijm steeds werd gemeten in het glasbuisje waarin

het was opgevangen. We gebruikten een kalomelelectrode als afleidelectrode. De glaselectrode werd voor iedere meting met gedistilleerd water afgespoeld en daarna met filtreerpapier gedroogd. Indien ons weinig materiaal ter beschikking stond, raakte de onderzijde van het glazen bolletje slechts even het slijm. Beschikten we over meer materiaal, dan werd de elektrode meestal tot plus minus $\frac{1}{4}$ van zijn hoogte hierin gedompeld. Daarna wachtten we enkele oogenblikken (meestal 2 à 3 minuten) totdat de potentiaal constant was. Bij het onderzoek van vele monsters achter elkaar verrichtten we hier tusschen door steeds enkele controle-metingen.

Bij de bepalingen merkten we reeds spoedig, dat niet ieder gedeelte van het onderzoekingsmateriaal dezelfde zuurgraad had. We vonden soms zelfs verschillen van 0.1—0.15. Meestal waren ze echter kleiner. Enkele voorbeelden, waarbij het secretum op drie plaatsen werd gemeten, kunnen dit demonstreeren.

Tabel 18.

7.35	7.35	7.34
6.93	6.99	6.91
7.06	6.98	7.04
7.63	7.58	7.72
8.08	8.09	8.04
7.44	7.56	7.44
7.73	7.71	7.73

Deze omstandigheid heeft ons ertoe gebracht, van elk monster constant op drie verschillende plaatsen de zuurgraad vast te stellen. Het gemiddelde van deze waarden vermeldden we dan als de zuurgraad van het onderzoeksobject.

In het geheel werd van 227 runderen, die in de oestrus verkeerden, de p_{H} van de vagina-inhoud bepaald. Het vaginaal-secretum beoordeelden we hierbij naar de kleur en consistentie. Verder werd van ieder dier aantekening gehouden omtrent ouderdom, ras en voedingstoestand, om na te gaan, of deze omstandigheden invloed uitoefenden op de aciditeit van de vagina. Steeds zorgden we, dat het materiaal afkomstig was van runderen, die niet lijdende waren aan een endometritis of infectieuze scheidecatarrh. Dieren, die eventueel hadden geaborteerd, werden even-

eens voor deze serie onderzoeken uitgesloten. We maakten de volgende indeeling van de verschillende zuurgraden.

Tabel 19.

Aantal dieren	pH
1	5.54
1	5.77
1	5.98
2	5.99
1	6.01
2	6.09
1	6.11
1	6.13
9	6.22 tot 6.55
17	6.73 tot 7.01
49	7.01 tot 7.24
63	7.24 tot 7.76
55	7.76 tot 8.23
14	8.23 tot 8.58
1	8.58
1	8.63
1	8.65
1	8.67
1	8.69
1	8.73
1	8.74
1	8.79
1	8.85
1	8.86

Uit deze tabel volgt, dat de p_H van de vagina der meeste runderen tusschen 7.01 en 8.23 lag. De door ons gevonden uitersten waren 5.54 en 8.86. Een oorzaak voor deze laatste waarden hebben we niet gevonden.

Wat de consistentie van het secretum in de oestrus betrof, konden we opmerken, dat deze in het meerendeel der gevallen dunvloeibaar was, een heel enkele maal in meer of mindere mate dikvloeibaar. De kleur wisselde van helder tot iets geelachtig; veelal was ze glazig, helder. Voor zoover als wij hebben kunnen nagaan had de consistentie, evenals de kleur, geen invloed op de zuurgraad van het onderzoeksobject.

Bij enkele monsters stelden we de aanwezigheid van urine vast. Deze hadden een zuurgraad in de buurt van 8, behalve één, waarbij we een p_H van 7.53 vonden. (Deze zijn niet in de voorgaande tabel aangegeven). Zooals men weet, is de urine van runderen in de meeste gevallen alcalisch en kan onder sommige omstandigheden b.v. door sterke vermagering, zware ziekte, een zure reactie verkrijgen. Daar het rund met het zure vaginaalsecretum (p_H 5.54)

in een cachectische toestand verkeerde, onderzochten we bij dit dier de p_H van de urine om een mogelijke verklaring te vinden voor deze zoo afwijkende waarde. De p_H van de urine bij dit rund was 8.07. De lage p_H van de vagina-inhoud was dus niet door bezoedeling met urine veroorzaakt.

Uit de onderzoeken konden we verder concludeeren, dat ouderdom en ras, evenals de voedingstoestand, de zuurgraad in het geheel niet beïnvloedden.

Naast het onderzoek van de vagina-inhoud in de bronstperiode, hebben we de p_H van het secretum van eenige gravide runderen nagegaan. Bij deze dieren was het onderzoekingsmateriaal veel vaster van consistentie, kleverig en dradentrekkend. De kleur wisselde van helder tot wit- en roomachtig. Het bevond zich als een prop bij de portio vaginalis uteri en spreidde zich op de bodem van de vagina uit. In onderstaande tabel zijn de gevonden waarden weergegeven.

Tabel 20.

Graviditeitsduur	consistentie en kleur van het secretum		pH
4 maanden	dikvloeibaar	witachtig	7.07
5 maanden	dikvloeibaar	helder	7.57
5 maanden	¹⁾ taai en zeer kleverig	geelachtig	7.73
6 maanden	taai en zeer kleverig	witachtig	7.39
6 maanden	taai en kleverig	witachtig	7.54
7 maanden	taai	geelachtig	7.81
7 maanden	zeer taai	witachtig	7.34
8 maanden	taai en zeer kleverig	roomachtig	7.52
9 maanden	dikvloeibaar	helder	7.31
²⁾ 9 maanden	dikvloeibaar	helder	7.09
³⁾ 9 maanden	dikvloeibaar	witachtig	7.24

¹⁾ Onder taai verstaan we een nog vastere consistentie, dan met dikvloeibaar wordt uitgedrukt.

²⁾ De partus geschiedde na drie weken.

³⁾ De partus geschiedde na twee weken.

Het was ons ook mogelijk vijf dieren eenige dagen voor de partus te onderzoeken, zooals uit de volgende tabel zal blijken, waarin eveneens de p_H van de allantoïsvloeistof is vermeld.

Tabel 21.

Aantal (dagen uren) voor de partus	Consistentie van het slijm	pH
Rund I	5 dagen	dikvloeibaar zeer kleverig 7.70
	4 dagen	dikvloeibaar zeer kleverig 7.79
	3 dagen	dikvloeibaar kleverig 7.61
	2 dagen	dikvloeibaar 7.63
	1 dag	min of meer vloeibaar 7.34
	3 uren	vloeibaar 7.29
De zuurgraad van de allantoïsvloeistof was 7.03.		
Rund II	4 dagen	dikvloeibaar kleverig 7.28
	3 dagen	dikvloeibaar 7.06
	1 dag	vloeibaar 7.25
	2 uren	zeer dunvloeibaar 7.36
De zuurgraad van de allantoïsvloeistof was 6.99.		
Rund III	5 dagen	dikvloeibaar kleverig 7.54
	4 dagen	dikvloeibaar kleverig 7.28
	3 dagen	dikvloeibaar 7.33
	1 dag	dikvloeibaar 7.36
	4 uren	vloeibaar 7.47
De zuurgraad van de allantoïsvloeistof was 7.01.		
Rund IV	3 dagen	vloeibaar 7.79
	2 dagen	vloeibaar 7.83
	1 dag	vloeibaar 7.81
	3 uren	dunvloeibaar 7.78
De zuurgraad van de allantoïsvloeistof was 6.95.		
Rund V	4 dagen	dikvloeibaar kleverig 7.01
	3 dagen	dikvloeibaar zeer kleverig 6.74
	2 dagen	dikvloeibaar 6.99
	1 dag	dikvloeibaar 7.35
De zuurgraad van de allantoïsvloeistof was 7.16.		

Uit deze tabel volgt, dat de vagina-inhoud niet iedere dag dezelfde pH bezat. De schommelingen waren zeer onregelmatig. Het muceuse secretieproduct was gedurende de dracht dikvloeibaar, kleverig en dradentrekkend, maar eenige tijd voor de partus trad er een vervloeiing op, als bij het door hypersecretie ontstane product in de bronstperiode.

In de volgende korte reeks onderzoeken gingen we de zuurgraad van het secretieproduct van runderen na, die lijdende waren aan fluor albus. Het viel ons hierbij op, dat de p_H van het secretieproduct van deze dieren in de meeste gevallen hoog was.

Tabel 22.

Aard en kleur van het secretum	p_H van het secretum
dunvloeibaar, lichtgeel	7.77
dikvloeibaar, donkergeel	7.83
dikvloeibaar, roomkleurig	7.94
dikvloeibaar, roomkleurig	7.78
dikvloeibaar, lichtgeel	7.96
dunvloeibaar, lichtgeel	7.37
dikvloeibaar, roomkleurig	7.85
dunvloeibaar, roomkleurig	8.14
dunvloeibaar, donkergeel	8.03
dikvloeibaar, roomkleurig	7.16
dikvloeibaar, lichtgeel	7.46
dunvloeibaar, lichtgeel	7.55
dunvloeibaar, roomkleurig	8.33

Verder onderzochten we dertien dieren, die niet in de bronstperiode waren, maar aan vaginitis infectiosa leden. Deze runderen behoorden aan een en denzelfden eigenaar en waren zeer lastig drachtig te krijgen.

De resultaten zijn in de volgende tabel neergelegd.

Tabel 23.

Aard en kleur van het secretum	p_H van het secretum
dikvloeibaar, helder	7.13
dikvloeibaar, helder	7.25
tamelijk dikvloeibaar, witachtig	6.97
dikvloeibaar, helder	7.14
vloeibaar, bruinachtig	7.35
dikvloeibaar, geelachtig	7.06
dunvloeibaar, helder met iets bloed	7.36
dikvloeibaar, geelachtig	6.66
dikvloeibaar, zeer kleverig, helder	7.48
dikvloeibaar, geelachtig	7.63
zeer taai, witachtig	6.94
zeer taai, helder	6.99
taai, geelachtig	7.24

Uit bovenstaande tabel volgt, dat bijna alle waarden lager zijn dan die van de voorgaande reeks.

Eveneens interesseerde het ons, hoe hoog de p_H op verschillende plaatsen van de genitaaltractus was (uterus, cervix en vagina). Het materiaal voor deze serie onderzoeken verkregen we van het

Tabel 24.

Ouderdom	Voedingstoestand	Uterussecretum			Cervicaalsecretum			Vaginaalsecretum		
		kleur	consistentie	pH	kleur	consistentie	pH	kleur	consistentie	pH
6 jaar	goed	geelachtig	dikvloeibaar	7.79	geelachtig	taai, zeer kleverig	7.58	witachtig	dikvloeibaar	7.77
3 jaar ¹⁾	matig	lichtgeel	dikvloeibaar	7.98	helder	dikvloeibaar	7.83	helder	dikvloeibaar, kleverig	7.25
± 10 jaar ¹⁾	matig	helder	taai	8.16	helder	taai	7.99	witachtig	dikvloeibaar	8.04
5 jaar?	zeer goed	lichtgeel	dunvloeibaar	7.15	lichtgeel	taai	7.36	helder	tamelijk dunvloeibaar	7.30
3 jaar ²⁾	matig				witachtig	taai	7.64	witachtig	taai	7.65
5 jaar	goed	witachtig	dikvloeibaar	7.42	witachtig	taai	7.33	helder	dikvloeibaar	7.59
4 jaar ¹⁾	goed	helder	tamelijk dunvloeibaar	8.07	helder	dikvloeibaar, kleverig	8.38	helder	dikvloeibaar	8.43
5 jaar	slecht	witachtig	dikvloeibaar	7.64	iets geelachtig	dikvloeibaar	7.62	helder	dikvloeibaar, kleverig	7.71
2 jaar ¹⁾	matig	geel	dikvloeibaar	7.45	geelachtig	dikvloeibaar	7.47	witachtig	dikvloeibaar	7.55
4 jaar	goed	geel	dunvloeibaar	7.96	witachtig	taai	7.99	helder	dikvloeibaar	7.99
? ¹⁾	slecht	³⁾			geelachtig	taai	7.81	witachtig	dikvloeibaar	7.92
6 jaar	matig	geel	dikvloeibaar	8.64	geelachtig	dikvloeibaar	8.21	geelachtig	dikvloeibaar	8.24
3 jaar ⁴⁾	matig	glashelder	dunvloeibaar	7.33	glashelder	dunvloeibaar	7.34	glashelder	dunvloeibaar	7.33

¹⁾ materiaal uit Utrecht afkomstig.

²⁾ 7 maanden gravide.

³⁾ te weinig om de pH te bepalen.

⁴⁾ dit dier was denklijk in de oestrus. Het linker ovarium, bevatte een niet gebersten Graaf's blaasje.

openbaar slachthuis te Utrecht en Groningen. Bij verschgeslachte runderen werden de genoemde organen uit het dier genomen en met een steriel mes in de lengterichting geopend. De inhoud werd daarna door middel van een steriele, hoornen lepel verzameld. Indien de vaginainhoud tijdens de slachting met urine werd bezoe-
deld, wat dikwijls geschiedde, werd dit niet voor deze serie onder-
zoekingen gebezigd. Het materiaal, dat we van het abattoir te
Groningen verkregen, werd binnen twee uren onderzocht. De
monsters uit Utrecht konden we daarentegen eerst na achttien uren
onderzoeken. Gedurende die tijd werden deze in ijs bewaard, na
toevoeging van een druppel toluol, om de bacteriewerking te rem-
men. Eveneens voegden we hier aan toe 6 $\frac{0}{100}$ NaF1, om een even-
tueele glycolyse tegen te gaan.

De resultaten zijn in tabel 24 neergelegd.

Uit bovenstaande tabel volgt, dat de kleur, consistentie en p_H
van het materiaal uit de verschillende deelen van de genitaaltractus
niet dezelfde waren. Veelal was de tint van het uterussecretum
in mindere of meerdere mate geel, dat van de cervix in het meeren-
deel van de gevallen witachtig tot geel. De p_H van het vaginaal-
secretum lag over het algemeen meer naar de basische kant dan die
van de cervix-inhoud (in tegenstelling met de toestand bij de
vrouw).

De proeven hebben zich verder uitgestrekt tot dagelijksche on-
derzoekingen van de vagina-inhoud bij vier runderen, om vast te
stellen of onder normale, physiologische verhoudingen de zuurgraad
schommelingen vertoonde. De resultaten van deze onderzoekingen
zijn in de volgende tabellen vastgelegd.

Tabel 25.

Bijzonderheden van het rund.

Dora II, Groninger blaarkop, 6 jaar.
Matige voedingstoestand; 3 maanden
geleden gekalfd. Geen afwijkingen van
de genitaalorganen.

Datum van onderzoek	kleur	Secretum consistentie	pH
2-3-'34	witachtig	dikvloeibaar ²⁾	7.92
3-3-'34	witachtig	dikvloeibaar ²⁾	7.50
5-3-'34	geelachtig	dikvloeibaar	7.54
6-3-'34	witachtig	dikvloeibaar	7.82
7-3-'34	witachtig	tamelijk dunvloeibaar	7.63

	8-3-'34	helder, glazig	dunvloeibaar	7.48
1)	9-3-'34	helder, glazig	dunvloeibaar	7.01
	10-3-'34	helder,	dunvloeibaar	7.15
	12-3-'34	helder met een weinig bloed	dunvloeibaar	7.37
	13-3-'34	helder	dikvloeibaar	8.01
	14-3-'34	helder	dikvloeibaar	8.02
	15-3-'34	witachtig	3) taai 2)	8.01
	16-3-'34	witachtig	dikvloeibaar 2)	8.06
	17-3-'34	helder	tamelijk dikvloeibaar	8.21
	18-3-'34	iets geelachtig	tamelijk dikvloeibaar	7.79
	20-3-'34	iets geelachtig	tamelijk dunvloeibaar	7.93
	21-3-'34	iets geelachtig	tamelijk dunvloeibaar	8.50
	22-3-'34	witachtig	dikvloeibaar 2)	8.45
	23-3-'34	witachtig	taai 2)	8.46
	24-3-'34	witachtig	taai 2)	7.87
	25-3-'34	iets geelachtig	taai 2)	7.89

1) bronstig.

2) erg kleverig.

3) onder taai wordt verstaan een vastere consistentie dan met de uitdrukking dikvloeibaar.

Tabel 26.

Bijzonderheden van het rund.

Griet IV, Groninger blaarkop, 4 jaar.
Goede voedingstoestand; 4 maanden ge-
leden gekalfd. Geen afwijkingen van
de genitaalorganen.

Datum van onderzoek	kleur	Secretum consistentie	pH
1) 2-3-'34	helder	dunvloeibaar	7.89
3-3-'34	helder	dunvloeibaar	7.43
5-3-'34	helder met op en- kele plaatsen een weinig bruin	dunvloeibaar	7.35
6-3-'34	helder	dikvloeibaar	7.76
7-3-'34	witachtig	dikvloeibaar	7.34
8-3-'34	iets geelachtig	tamelijk dikvloeibaar 2)	7.99
9-3-'34	iets geelachtig	tamelijk dikvloeibaar 2)	8.05
10-3-'34	geelachtig	dikvloeibaar 2)	7.56
12-3-'34	geelachtig	dikvloeibaar 2)	8.03
13-3-'34	witachtig	taai 2)	7.82
14-3-'34	witachtig	taai 2)	7.81
15-3-'34	witachtig	taai 2)	7.55
16-3-'34	witachtig	taai 2)	7.61
18-3-'34	witachtig	tamelijk dikvloeibaar	7.47
19-3-'34	iets witachtig	tamelijk dikvloeibaar	7.53
20-3-'34	iets witachtig	dikvloeibaar	7.14
21-3-'34	witachtig	dikvloeibaar	7.53
1) 23-3-'34	helder	dunvloeibaar	7.92
24-3-'34	helder	dunvloeibaar	7.93
25-3-'34	helder	tamelijk dikvloeibaar	7.82
26-3-'34	witachtig	tamelijk dikvloeibaar	7.64

Tabel 27.

Bijzonderheden van het rund.

Jo II, Groninger blaarkop, 5 jaar.
In zeer goede voedingstoestand; 9 maanden geleden gekalfd. Lijdende aan een chronische streptococce mastitis. Geen afwijkingen van de uterus en vagina.

Datum van onderzoek	kleur	Secretum consistentie	pH
25-4-'34	geelachtig	dunvloeibaar	7.34
26-4-'34	geelachtig	dunvloeibaar	7.44
27-4-'34	geelachtig	dikvloeibaar	8.36
28-4-'34	witachtig	dikvloeibaar ²⁾	7.80
29-4-'34	helder	tamelijk dunvloeibaar	7.51
30-4-'34	geelachtig	dikvloeibaar	7.65
1-5-'34	geelachtig	dikvloeibaar ²⁾	7.20
2-5-'34	helder	dikvloeibaar ²⁾	8.51
3-5-'34	geelachtig	dunvloeibaar	7.79
4-5-'34	geelachtig	tamelijk dunvloeibaar	8.55
5-5-'34	geelachtig	dikvloeibaar	7.32
6-5-'34	witachtig	dikvloeibaar ²⁾	7.14
7-5-'34	helder	dikvloeibaar	7.08
8-5-'34	helder, glazig	dunvloeibaar	7.14
¹⁾ 9-5-'34	helder, glazig	dunvloeibaar	7.06
10-5-'34	helder	dunvloeibaar	7.09
11-5-'34	helder	dikvloeibaar	7.68
12-5-'34	helder	dikvloeibaar	7.53
13-5-'34	helder	taai	7.71
14-5-'34	helder	taai	7.62
15-5-'34	iets geelachtig	dikvloeibaar	7.77
16-5-'34	iets geelachtig	dikvloeibaar	7.61
17-5-'34	iets geelachtig	dikvloeibaar	7.45
18-5-'34	iets geelachtig	dikvloeibaar	7.42

Tabel 28.

Bijzonderheden van het rund.

Aaltje V, Groninger blaarkop, 4½ jaar.
In matige voedingstoestand. Drie maanden geleden gekalfd. Geen afwijkingen van uterus en vagina.

Datum van onderzoek	kleur	Secretum consistentie	pH
25-4-'34	witachtig	taai ²⁾	7.96
26-4-'34	witachtig	taai ²⁾	8.10
27-4-'34	helder	taai ²⁾	7.86
28-4-'34	iets geelachtig	dikvloeibaar	7.73
29-4-'34	helder	dikvloeibaar	7.35
30-4-'34	helder	dikvloeibaar	6.76
1-5-'34	iets geelachtig	taai	6.99
2-5-'34	iets geelachtig	dikvloeibaar ²⁾	7.27
3-5-'34	witachtig	dikvloeibaar	7.70
4-5-'34	witachtig	tamelijk dunvloeibaar	7.01
5-5-'34	helder	tamelijk dunvloeibaar	7.32

	6—5—'34	helder, glazig	dunvloeibaar	7.48
1)	7—5—'34	helder, glazig	dunvloeibaar	7.56
	8—5—'34	helder, glazig	dunvloeibaar	7.55
	9—5—'34	helder, glazig	dikvloeibaar	7.59
	10—5—'34	bruinachtig	dikvloeibaar	7.36
	11—5—'34	witachtig	dikvloeibaar	7.48
	12—5—'34	iets witachtig	dikvloeibaar	7.99
	13—5—'34	geelachtig	dikvloeibaar	8.20
	14—5—'34	helder	tamelijk dikvloeibaar	7.63
	15—5—'34	helder	dikvloeibaar ²⁾	7.44
	16—5—'34	iets witachtig	taai ²⁾	7.36
	17—5—'34	iets witachtig	taai ²⁾	7.42
	18—5—'34	iets witachtig	taai ²⁾	7.41

Uit deze vier tabellen volgt, dat de p_{H} van de vagina-inhoud iedere dag verschillend is. In deze schommelingen konden we echter geen enkele regelmatigheid aantonen. Gedurende het grootste deel van de oestriscche cyclus was het secretum meer of minder taai, dikvloeibaar, terwijl het in de oestrus veel dunner van consistentie werd. Deze dunvloeibaarheid duurde veelal één of enkele dagen. Bij één rund vonden we op de tweede dag na de oestrus een weinig bloed in het secretieproduct. Het slijm van twee dieren vertoonde op de tweede en derde dag een eenigszins bruine verkleuring. De kleur van het oestrusslijm van bovengenoemde vier runderen was helder, glazig, ofschoon het bij andere dieren wel voorkwam, dat het meer witachtig of iets geel getint was. In de overige dagen van de cyclus varieerde de kleur van helder, witachtig, tot min of meer geel.

Na het mededeelen van deze onderzoeken betreffende het muceuse secretum, keeren wij terug tot ons uitgangspunt. Ons doel was namelijk de p_{H} van de vagina der runderen vóór de cohabitatie te veranderen.

De volgende methoden zijn te dien einde toegepast:

- Irrigeeren met acidum lacticumoplossingen.
- Irrigeeren met bicarbonas-natricusoplossingen.
- Poederen van de penis en vagina met NaHCO_3 .

Deze laatste methode werd door *U n t e r b e r g e r* ook bij den mensch gebezigd. Wij behandelden op deze wijze 43 dieren. Tot onze groote spijt kunnen we de resultaten hiervan niet mededeelen, daar deze stal zonder onze voorkennis is verkocht en de runderen niet meer opgespoord konden worden.

Het spreekt vanzelf, dat we voor deze serie proeven de medewerking van de vee-eigenaren in de eerste plaats noodig hadden.

In het begin werden de onderzoeken verricht bij runderen behorende aan veehouders om de stad Utrecht. Infectie met abortus Bang was bij deze dieren geen zeldzaamheid, zoodat evengoed als in andere jaren, de bevruchting vaak moeilijkheden opleverde. Deze eigenaren hadden spoedig groote bezwaren tegen de behandeling, daar zij het opbreken der runderen toeschreven aan de irrigatie. De meeste proeven zijn daarna verricht op stallen van vooraanstaande fokkers ¹⁾ in de provincie Groningen, waar de dieren niet aan abortus Bang-infectie of colpitis infectiosa leden.

Het irriteren geschiedde met behulp van een slang en trechter. De oplossingen werden steeds lauw warm in de vagina geïnfundeerd en 15 minuten later werd het rund gedekt.

Naar *U n t e r b e r g e r* ons schriftelijk mededeelde, spoelde hij de vagina der runderen uit met een oplossing van een kleine theelepel melkzuur op 1 Liter warm water. Wij behandelden de dieren met verschillende concentraties melkzuur- en bicarbonas-natricus-oplossingen; voor ieder dier gebruikten we 1 Liter vloeistof. Een kwartier na de infusie bevatte de vagina over het algemeen slechts weinig vloeistof meer. De resultaten van deze serie onderzoeken zijn in het volgende weergegeven.

Met 0.5 % NaHCO_3 solutie werden 108 dieren behandeld, waarvan 21 runderen zijn opgebroken, terwijl 87, nadat de infusie vóór de copulatie was toegepast, drachtig werden. Het geslacht van de kalveren was 51 ♂ en 36 ♀.

G.V. zonder behandeling = 51.69 % (107 ♂ : 100 ♀).

G.V. met behandeling = 58.62 %.

$m_1 = 5.28.$ $m_2 = 3.47.$

G.V. diff. $\pm m_{\text{diff.}}$ = $6.93 \pm 6.32.$

Op grond van de overwegingen reeds bij de resultaten van de proeven met de andere dieren vermeld, mag geen invloed toegeschreven worden aan deze alcali-behandeling.

Verder behandelden we 69 dieren met 0.75 % bicarbonas natricus oplossing, waarvan 11 dieren niet drachtig werden. Het geslacht van deze kalveren was 34 ♂ en 24 ♀.

G.V. met behandeling = 58.62 %.

$m_1 = 6.47.$ $m_2 = 3.47.$

G.V. diff. $\pm m_{\text{diff.}}$ = $6.93 \pm 7.41.$

¹⁾ Alle personen die hun medewerking hiertoe hebben verleend, zeggen we ook op deze plaats hartelijk dank.

Voor deze groep geldt hetzelfde als voor de eerste serie runderen. Ook hier mogen we niet spreken van een door de behandeling ontstane geslachtsverschuiving.

Voor de irrigaties met melkzuuroplossingen gebruikten we de concentraties 5 ‰, 1.20 ‰ en 0.50 ‰.

Vijftien dieren behandelden we met de 5 ‰ soluties, die echter allen na de infusie zijn opgebroken. Het aantal runderen dat we met een 1.2 ‰ oplossing hebben behandeld was 29, waarvan slechts 9 drachtig werden. Het geslacht van de vruchten was 5 ♂ en 4 ♀. Met 0.5 ‰ melkzuuroplossing werden 217 dieren geïrrigeerd. Hiervan zijn 105 runderen niet drachtig geworden. Van de 112 overgeblevenen was het geslacht der kalveren 59 ♂ en 53 ♀. G.V. zonder behandeling = 51.69 %.

G.V. met behandeling = 52.68 %.

$m_1 = 4.72.$ $m_2 = 3.47.$

G.V. diff. $\pm m$ diff. = $0.99 \pm 5.86.$

De behandeling met 0.5 ‰ acidum lacticum moet dus ook als volkomen negatief beschouwd worden.

De bedoeling van het infundeeren van deze vloeistoffen was natuurlijk om de p_H in de vagina naar de zure of basische zijde te verschuiven. De vraag is echter wat wij met de behandeling in dit opzicht hebben bereikt. Was het inderdaad mogelijk door de genoemde toepassingen in de vagina een andere reactie teweeg te brengen, zoodat we daarna mochten spreken van de p_H in de vagina. Uit verschillende proeven bleek ons, dat dit onmogelijk was en dat er na de behandeling geen sprake was van één bepaalde p_H . Na de irrigatie met alcali of zuur was er op verschillende plaatsen in de vagina een heel verschillende p_H . Het slijmige secretieproduct mengde zich, dank zij het muceuse karakter, niet of heel slecht met de irrigatievloeistof. Dit had ten gevolge, dat de zuurgraad aan de oppervlakte van een slijmdraad of slijmpropje een andere was dan in de diepere lagen. De p_H van het secretum was, zooals we vroeger reeds zagen, in normale omstandigheden, ook op alle plaatsen niet dezelfde, maar na de irrigatie bleken deze verschillen echter veel grooter te zijn, zooals in de volgende tabellen is aangegeven. Verder verschilde de p_H van de slijmige substantie zoo goed als steeds met de irrigatievloeistof, waarin de gezwollen slijmpropjen als het ware zweefden. We mogen dus in

geenen deele spreken na de infusie van de p_{H} van de vagina-inhoud, hoogstens van een gemiddelde van de gevonden waarden, die bij NaHCO_3 behandeling tusschen ± 7.60 en ± 8.05 gelegen waren.

Een kwartier na de infusie met de basische oplossingen vonden wij b.v. de volgende waarden voor de p_{H} van de irrigatievloeistof en het er in „zwevende” slijm:

Tabel 29.

pH van het slijm ¹⁾	pH van de vloeistof
7.85	7.98
7.69	7.87
8.16	8.08
7.78	7.99
7.45	7.73
7.84	8.10
8.06	8.05

¹⁾ De glaselectrode raakte hier slechts de oppervlakte van het secretum.

Uit deze tabel volgt, dat de p_{H} van het secretieproduct steeds in eenige mate afwijkt van die van de vloeistof, terwijl in de meeste gevallen de p_{H} van de laatste hooger was dan van het secretum. Dergelijke metingen konden helaas bij lang niet alle dieren geschieden, aangezien de eigenaren meestal bedenkingen daartegen aanvoerden.

In de volgende tabel zijn enkele gegevens vermeld betreffende de meting op verschillende plaatsen in het slijm.

Tabel 30.

pH van het slijm, aan de oppervlakte gemeten, 15 min. na de behandeling met de NaHCO_3 oplossingen	pH van het slijm in diepere lagen gemeten, 15 min. na de behandeling met de NaHCO_3 oplossingen
7.89	7.78
7.97	7.74
8.03	7.99
8.10	7.58
7.82	7.98
7.71	7.79
7.99	7.58

Brachten we een druppel sperma met een weinig bronstsljm van een niet behandeld rund, tezamen onder de microscoop, dan namen we waar, dat de spermatozoiden zich in deze substantie bijzonder actief konden bewegen. Bekeken we verder microscopisch een druppel spermavloeistof met een weinig secretum en irrigatievloei-

stof van een rund, dat 15 minuten geleden met een 0.5 % of 0.75 % bicarbonas natricussolutie behandeld was, dan bleek ons, dat de spermieën in het secretum lang beweeglijk bleven; in de eerste oogenblikken vertoonden ze eveneens een actieve beweging in de vloeistof rondom het slijm, doch verloren hierin zeer spoedig hun beweeglijkheid. Hieruit is te concludeeren, dat het bronstsljm een goed milieu vormde voor de zaadcellen en deze zodoende beschutten tegen de invloed van de infusievloeistof.

Evenals bij de met bicarbonas natricusoplossing geïrrigeerde dieren, was de p_H in de vagina van de runderen, die met melkzuur waren behandeld niet overal dezelfde. Zoo vonden we o.a. de volgende waarden 15 minuten na de irrigatie met 0.5 $\frac{0}{100}$ acidum lacticumoplossing.

Tabel 31.

pH van het secretum aan de oppervlakte gemeten	pH van het secretum in de diepte gemeten	pH van de vloeistof die nog in de vagina aanwezig was
4.68	6.91	4.00
4.13	7.22	3.46
4.79	6.98	4.63
3.53	5.33	3.48
5.50	7.72	4.72
5.04	7.34	4.61
4.91	7.25	4.23
3.86	4.31	3.72
3.75	4.46	3.66
5.23	7.86	4.91

Uit deze tabel mogen we concludeeren, dat de vloeistof in de vagina steeds een lagere p_H bezat dan het secretum. Verder was het een groot verschil of we de p_H van het secretieproduct aan de oppervlakte of in de diepte bepaalden. De p_H aan de oppervlakte was lager dan in het inwendige.

Het bronstsljm was na deze behandeling met 0.5 $\frac{0}{100}$ melkzuuroplossing veelal witachtig, niet meer glashelder en in meerdere of mindere mate vaster van consistentie dan voordien.

Indien we aan een weinig vagina-inhoud van een rund, dat 15 minuten geleden met een 0.5 $\frac{0}{100}$ melkzuuroplossing was behandeld, een druppel spermavloeistof toevoegden en dit microscopisch onderzochten, dan merkten we op, dat de spermieën in de vloeistof binnen zeer korten tijd onbeweeglijk waren, terwijl die in de muceuse substantie nog lange tijd een levendige beweging vertoonden.

Uit deze proeven met runderen kunnen we de volgende conclusies trekken:

De behandeling van de vaginae met oplossingen als 0.5 % NaHCO_3 , 0.75 % NaHCO_3 , 5 ‰, 1.2 ‰ en 0.5 ‰ melkzuur, heeft geen invloed op de geslachtsverhouding der nakomelingen; de hypothese van Unterberger kan dus niet worden bevestigd. Bovendien zijn deze irrigaties, vooral met melkzuur, niet zonder invloed op de bevruchtungskans.

HOOFDSTUK III.

ENKELE ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE p_H
VAN HET SPERMA VAN DEN STIER.

Indien de hypothese van *Unterberger* juist was, dat de zuurgraad van de vagina een groote invloed uitoefende op de geslachtsverhouding der jonge individuen, dan zou de p_H van het geëjaculeerde sperma hierbij ook een niet te miskennen rol kunnen spelen. Onze opgave in deze was dan ook, om na te gaan binnen welke grenzen de H-ionenconcentratie van het sperma van den stier schommelde.

In de literatuur konden we over dit onderwerp zeer weinig vinden. Wel was het reeds lang bekend, dat het sperma van enkele zoogdieren alcalisch reageerde. Dit was door verschillende onderzoekers titrimetrisch bepaald zooals o.a. *Yamane* en *Sato* bij paardensperma, *Hirokawa* en *Ochi* bij rattensperma. Met betrekking tot de H-ionenconcentratie van het sperma van den stier stond ons slechts één publicatie, die van *Redenz*, ter beschikking. Met behulp van de indicatorenmethode van *Sørensen—Michaëlis* onderzocht deze de vloeistof, die hij verkreeg uit de testikels van slachtdieren en kwam na het beëindigen van zijn onderzoekingen tot de conclusie, dat de vloeistof uit het rete testis een gemiddelde p_H had van 7.5 en die van het secretum uit de cauda epididymidis in de buurt van het neutrale punt lag. Over de p_H van het ejaculaat van den stier was dus blijkbaar nog niet gewerkt.

Om het probleem betreffende de aciditeit van het sperma van den stier op te lossen, was het een eerste vereischte het materiaal op een zoo zuiver mogelijke wijze te verzamelen, opdat alle onreinheden werden vermeden en de juiste p_H meting werd toegepast. Ter verkrijging van dit materiaal werden verschillende methoden door ons gebezigd.

De bij vele onderzoekers meest gebruikelijke methode was die, waar men na de copulatie met een schoone hand het sperma uit de van te voren gereinigde vagina naar buiten bracht.

In plaats van gebruik te maken van de handen kan het verzamelen ook geschieden met behulp van een glazen of hoornen lepel of sputumvang. Deze methode is voor de meeste onderzoekingen misschien wel voldoende; om echter zuiver physisch-

chemische bepalingen te verrichten, leek het ons, met het oog op de door zoovele omstandigheden te beïnvloeden p_{H} , niet verantwoord deze methode voor onze proeven toe te passen. De kans bleef n.l. steeds bestaan, dat iets van het vaginaalslijm werd medegenomen; eveneens was het lastig het weinig geëjaculeerde sperma uit de vagina te verkrijgen. Vervolgens hebben we getracht het sperma, dat vóór en na de copulatie uit de penis van den stier spuit of druppelt, op te vangen. Deze methode bleek ook niet ideaal te zijn. Het zoo verkregen materiaal was in tegenstelling met het in de vagina geëjaculeerde, bijna steeds helder, waterachtig van kleur en gering van hoeveelheid. Dit heldere vocht bevatte verder in verhouding met dat uit de vagina genomen, weinig spermatozoïden en vele niet levenskrachtige. Men is dus niet gerechtigd deze vloeistof op één lijn te stellen met het normaal geëjaculeerde.

R o e m m e l e gaf enkele jaren geleden een andere methode aan, welke wij ook hebben toegepast. Hierbij maakten we gebruik van een min of meer buisvormig verzamelapparaat (praeservatief) welke na invetting in de vagina van de koe werd gebracht. Het vooreinde hiervan was koepelvormig en rustte tegen de cervix. De lengte van dit instrument was gelijk aan die van de scheede en bedekte deze laatste geheel. Het werd gemaakt van gummi met het open einde over een metalen ring gespannen. We brachten verder achter om deze ring een stevige gummi plaat aan, om te voorkomen, dat bij de copulatie de penis niet langs het instrument in de vagina kwam. De ejaculatie geschiedde in de gummi buis. Het sperma werd op deze wijze zoo zuiver mogelijk verkregen. Ofschoon deze methode door verschillende onderzoekers (W a l t o n, H a m m o n d, K u s n e t z o w a, M i l o w a n o w, N e u m a n n, D o n h a m, S i m m s) wordt aanbevolen, hebben wij ze toch verlaten. Wij ondervonden bij de koeien n.l. het nadeel, dat de dieren na het brengen van het instrument in de vagina, meestal begonnen te persen, de rug kromden en de copulatie niet vlot geschiedde. Verder hadden we het bezwaar, dat bij meermaalig gebruik van hetzelfde rund de vaginawand soms min of meer werd geïrriteerd. Ook was het lastig het instrument in de vagina te brengen en het te fixeeren tijdens de cohabitatie.

Eenige onderzoekers als M i l l e r, E v a n s, C a s e en F i n c h e r vermeldden, dat het sperma kon worden verkregen door massage van de zaadblaasjes en ampullae van de ductus deferens, door middel van rectale exploratie. Volgens de beide

eersten zou men bij massage van de zaadblaasjes slechts een troebele vloeistof verkrijgen met epitheelcellen zonder spermatozoën, terwijl bij massage van de ampullae een groote hoeveelheid troebele vloeistof werd verzameld met vele zaadcellen. Na twee minuten zou het resultaat reeds zijn waar te nemen. Wij hebben deze wijze van onderzoek ook gebezigd, maar de hoeveelheid van het sperma was zeer gering, plus minus 1 cc.

De methode die door ons steeds werd toegepast, was technisch iets nieuws van de laatste drie jaren en werd vooral uit Rusland gepropageerd. Deze methode heeft zich aldaar geheel ingeburgerd en wordt toegepast om het sperma te verkrijgen voor de artificieele inseminatie. Het hierbij gebruikte instrument was geconstrueerd door Milowanow, Neumann, Kusnetzowa e.a. Dank zij de medewerking van Prof. Neumann mochten we een dergelijk apparaat uit het „Institut of Animal Husbandry” te Moskow, ontvangen. Het bedoelde instrument was als het ware op te vatten als een kunstmatige vagina, waarin de copulatie plaats vond en

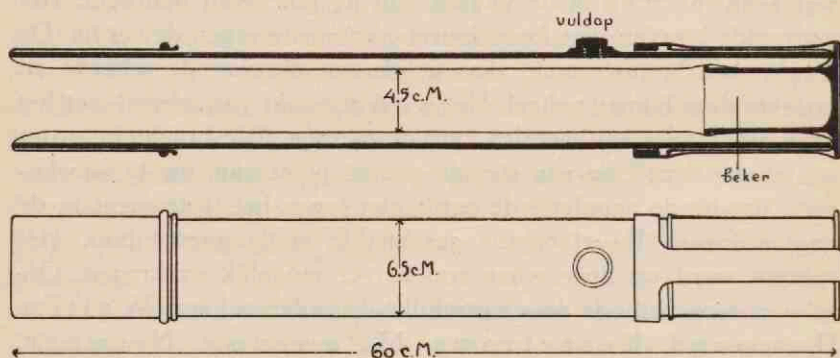


Fig. 4.

waarbij het sperma in een steriel bekersglas werd opgevangen. Ze bestond uit een 60 c.M. lange cilindrische buis van hard gummi, met een doorsnede van $6\frac{1}{2}$ c.M. (fig. 4). In deze cylinder bevond zich een dunne gummi band van 4.5 c.M. doorsnede, waarvan het open einde over de hard gummi cylinder zat gespannen. Deze spanning mocht echter niet te straf zijn. De ruimte tusschen de harde en zachte gummi wand vulden we via een dop met water, dat op een temperatuur van $\pm 50^{\circ}$ C. was gebracht. De ingang van de dunne gummi band werd dus nauwer door de druk van het water. Er moest eigenlijk zooveel water in de ruimte tusschen de beide wanden zijn, dat indien het instrument onder een hoek

van 60° werd gehouden, de onderste ingang van de binnenste buis werd afgesloten. Deze laatste collabeerde hierdoor iets en zou voor het gevoel van den stier geheel met de gewone uitwendige genitalien overeen kunnen komen. Aan het eene einde bevond zich een steriel bekerglas, bevestigd door middel van een gummi overslag (zie fig. 4). Vóór het gebruik werd het instrument met water gereinigd, daarna met 70 % alcohol en vervolgens uitgespoeld met lauw warme Ringer'sche vloeistof of physiologische keukenzoutoplossing. Het steriele bekerglas werd aan het eene einde bevestigd en het andere einde van het apparaat werd ingevet met een weinig neutrale vaseline.

Vóór de copulatie reinigden we het praeputium van den stier door spoeling met een zeepoplossing om het smegma en ander vuil te verwijderen, terwijl de haren daar ter plaatse werden weggeknipt. Daar wij niet steeds over een bronstig rund konden beschikken, gebruikten we een nymphomane koe, die den stier rustig toeliet. De Russische onderzoekers maakten bij paard en schaap in plaats van nymphomane dieren gebruik van phantomen, die voorzien waren van een kunstmatige vagina, waarin het sperma werd opgevangen. Bij de copulatie stonden we rechts van het dier (de Russen prefereeren de linkerkant) en met de rechterhand hielden we de kunstmatige vagina in schuine richting. Met de linker hand leidden we, door het praeputium te grijpen, de penis in de door het water bijna geheel gesloten opening van het instrument. Meestal volgde hierop direct de ejaculatie. Na eenige routine konden we zodoende steeds het sperma verkrijgen. De cohabitatie geschiedde op geheel normale wijze, terwijl het sperma direct in het bekerglaasje verzameld kon worden. Het was zaak niet te veel warm water in de genoemde ruimte te brengen, daar anders een groote hoeveelheid water naar de eene zijde van het instrument werd verplaatst en het bekerglas, dat precies om de opening sloot, de druk niet kon weerstaan.

Op deze wijze konden we vaststellen, dat bij iedere sprong de stier gemiddeld 4.6 cc. sperma ejaculeerde (de Russische onderzoekers deelden mede 4.7 cc.) met als uiterste grenzen 2.5—6 cc.

Het op deze wijze verkregen sperma was op de meest zuivere manier gewonnen, zonder eenige verontreiniging en het meest geschikt voor biochemisch onderzoek, terwijl de methode na eenige routine zeer eenvoudig was.

Voor de bepaling van de H-ionenconcentratie pasten we de

methode met de glaselectrode toe. De elektrode raakte hier slechts de oppervlakte van het onderzoeksobject. De experimenten werden bij verschillende stieren verricht en verscheidene malen herhaald.

Wat de kleur, evenals de consistentie van het ejaculaat betrof, viel het direct op, dat deze niet steeds bij alle dieren constant was, eveneens niet bij hetzelfde dier.

De consistentie van het geëjaculeerde sperma van den stier varieerde van vloeibaar tot min of meer lobbijg, gelijkende op die van room. De kleur wisselde van troebel, ondoorzichtig, witachtig tot geel. Hoe meer waterachtig, helder, het ejaculaat was, des te geringer was het aantal van de spermatozöiden.

De p_H metingen werden bij het materiaal van vijf stieren ($A \pm E$) verricht. De bepalingen geschieden hoogstens vijftien minuten na het verzamelen van het ejaculaat. De resultaten zijn in de volgende tabel weergegeven.

Tabel 32.

No. van het sperma	pH van het sperma
A 1	7.69
A 2	7.01
A 3	7.93
A 4	7.40
A 5	7.36
A 7	7.67
A 10	6.99
A 11	7.51
A 12	7.34
A 13	7.67
A 15	8.25
A 16	7.99
A 17	7.68
A 19	7.51
A 20	7.50
A 21	7.48
A 22	6.88
A 23	6.97
A 24	7.24
A 25	6.51
B 1	7.38
B 2	7.45
B 3	7.68
B 5	7.37
B 6	7.63
B 7	7.42
C 1	7.26
C 2	7.38
C 3	8.36
C 4	7.63
C 5	7.77

D 1	7.20
D 2	7.63
D 3	7.34
D 4	6.84
D 5	6.95
D 6	7.23
D 7	7.82
D 8	7.83
D 9	7.68
D 11	7.73
D 12	7.41
D 13	7.36
E 1	7.72
E 2	7.63
E 3	7.98
E 4	7.93
E 5	7.21
E 6	8.27
E 7	8.67
E 8	8.03
E 9	7.27
E 10	7.36
E 11	7.15
E 12	7.19
E 13	7.31
E 14	7.38

Uit deze metingen met de glaselectrode volgde, dat de p_H van het sperma van den stier lag tusschen 6.51 en 8.67. Het materiaal A 10 en A 11, A 22 en A 23, B 4, B 5 en B 6 waren een kwartier na elkaar gewonnen, evenals E 4, E 5 en E 6. Verder kwamen wij op grond van deze onderzoekingen tot de conclusie, dat de hoeveelheid, kleur, consistentie en p_H van het sperma ook bij denzelfden stier aan zeer groote schommelingen onderworpen waren. De eene keer was het materiaal na de ejaculatie dikvloeibaar, geelachtig of witachtig, de andere keer meer dunvloeibaar en waterachtig.

Het interesseerde ons eveneens, hoe de zuurgraad zou veranderen na toevoeging van een hoeveelheid zure of basische vloeistof. Hiervoor gebruikten we $\frac{1}{50}$ n NaOH en $\frac{1}{50}$ n HCl en hebben de resultaten in het volgende neergelegd. Het sperma verkregen we door de samenvoeging van 3 ejaculaties van denzelfden stier, binnen de tijd van vijftien minuten verzameld.

Onverdund rundersperma p_H 7.25, gemeten $\frac{1}{4}$ uur na het verzamelen.

Tabel 33.

1 cc. sperma + 1 cc. geredestilleerd CO_2 vrij water	pH 7.25
1 cc. sperma + 0.1 cc. n/50 NaOH, aangevuld met geredestilleerd water tot 2 cc. 7.32
1 cc. sperma + 0.2 cc. n/50 NaOH, aangevuld met geredestilleerd water tot 2 cc. 7.88

1 cc. sperma	+ 0.3 cc. n/50 NaOH, aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	8.02
1 cc. sperma	+ 0.4 cc. n/50 NaOH, aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	8.53
1 cc. sperma	+ 0.5 cc. n/50 NaOH, aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	8.89

Tabel 34.

1 cc. sperma	+ 0.1 cc. n/50 HCl., aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	pH 7.03
1 cc. sperma	+ 0.2 cc. n/50 HCl., aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	6.86
1 cc. sperma	+ 0.3 cc. n/50 HCl., aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	6.72
1 cc. sperma	+ 0.4 cc. n/50 HCl., aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	6.66
1 cc. sperma	+ 0.5 cc. n/50 HCl., aangevuld met gereedstilleerd water tot 2 cc.	6.33

Eveneens onderzochten we enkele sperma-monsters, die we verkregen uit de genitaaltractus van stieren direct na het doodden. Een geschikte plaats om het spermamateriaal op deze wijze te verzamelen, bleek ons de ampullen van de ductus deferentes te zijn. Zooals men weet, zijn dit vergrootte glandulaire gedeelten van de ductus met een lengte van ± 8 à 10 c.M. en gelegen juist voor de vereeniging met de urethra. Deze secreties waren nog niet gemengd met de producten van de zaadblaasjes, prostaat en bulbourethraalklieren. Behalve uit deze ampullen, onderzochten we de inhoud van de cauda epididymidis van eenige testikels. De resultaten van deze serie p_H bepalingen zijn in de volgende tabel neergelegd.

Tabel 35.

Plaats van het sperma	Kleur en consistentie van het sperma	pH van het sperma
cauda epididymidis	witachtig, dikvloeibaar	7.35
" "	" "	6.94
" "	roomkleurig, "	7.23
" "	geelachtig, dunvloeibaar	7.29
ampullae duct.def.	witachtig, dunvloeibaar	7.61
" "	" "	7.25
" "	geelachtig, dikvloeibaar	7.66
" "	" "	8.01
" "	witachtig, dunvloeibaar	7.06
" "	" "	7.12
" "	" , zeer "	6.74
" "	geelachtig, dunvloeibaar	7.00

Op grond van deze onderzoekingen mogen we concludeeren, dat de p_H van deze secretieproducten lang niet steeds dezelfde waarde had; verder, dat het materiaal een gevarieerd karakter vertoonde. De kleur wisselde van witachtig tot geelachtig en roomkleurig, terwijl de consistentie dun- of dikvloeibaar was.

HOOFDSTUK IV.

SCHEIDING DER TWEE SOORTEN SPERMATOZOÏDEN
DOOR MIDDEL DER KATAPHORESE.

Inleiding.

Onze onderzoekingen om de geslachtsverhouding der dieren te beïnvloeden, hebben zich behalve door middel van de verandering van de aciditeit van het vaginaalsecretum, ook uitgestrekt over een aantal experimenten, die beoogden, om reeds vóór de conceptie een scheiding van de twee soorten spermïën te verkrijgen door middel der *kataphorese* (*electrophorese*).

De resultaten hiervan veroorloven we ons, met de wijze van onderzoek, in het volgende mede te deelen.

Het is reeds lang bekend, dat een in een vloeibaar medium gesuspendeerd deeltje in het algemeen een electriche lading heeft ten opzichte van dit medium.

Indien men nu twee electroden in deze suspensie plaatst en tusschen deze beide een electriche spanning aanbrengt, dan zal het gesuspendeerde deeltje in beweging komen en zich naar de tegengesteld geladen pool bewegen. Dit verschijnsel is bekend als *kataphorese* en kan microscopisch of ultra-microscopisch vervolgd worden.

De *richting van de beweging* hangt gedeeltelijk af van de chemische samenstelling van de gesuspendeerde deelen en gedeeltelijk van de aard van het medium.

De *snelheid*, waarmede het deeltje zich verplaatst, de *kataphorese-snelheid*, wordt uitgedrukt in de formule van von Smoluchowski. Deze geeft aan, dat binnen zekere grenzen de snelheid evenredig is met het tusschen de electroden aangebrachte potentiaalverval, eveneens evenredig met het electrokinetisch potentiaalverval tusschen partikeltje en milieu en omgekeerd evenredig met de viscositeit van de vloeistof waarin het is gesuspendeerd. De grootte en vorm van het microscopisch zichtbare deeltje heeft vrijwel geen invloed op de electrophoretische snelheid.

Nauw hiermede hangt het verschijnsel samen, dat een vloeistof zich beweegt langs een wand ten gevolge van een aangebrachte electromotorische kracht, waarvoor men de naam *electro-endomose* heeft vastgesteld.

Zooals men weet, is het *sperma* een organische suspensie bestaande uit *spermaserum* en *spermatozoën*. De laatste zijn een product van het testikel-parenchym, het actieve element met een levendige beweging, het eerste is als suspensie-vloeistof op te vatten, die een uitscheidingsproduct van de mucosa der genitaaltractus en accessoire klieren (zaadblaasjes, prostaat, epididymis, ductus deferens met ampul, bulbo-urethraalklieren) is.

Het *spermaserum* bestaat volgens verschillende onderzoekers (Bethe, Höber, Landois-Rosemann, Yamane) uit eiwitten, eiwitachtige stoffen en verschillende electrolyten. Gelijk bekend, hebben de eiwitten uit de levende natuur een elektrische lading afhankelijk van de waterstofionen-concentratie der omgeving. Het eiwitsof is in een alcalisch milieu negatief geladen en in een zuur milieu positief. (Wopauli, H. R. Kruyt en H. G. de Jong).

Eenvoudig voorgesteld bestaat een *spermatozoïd* uit een kop, verbindingsstuk en staart. De kop bevat de kern van het organisme. Het verbindingsstuk achter de kop is het reguleerend centrum, dat zijn prikkels ontvangt van het milieu. Volgens Mettenleiter zouden deze zaadcellen „die komplizierteste aller Eiweiszkomplexe” zijn.

Wat het protoplasma betreft, heeft men alle reden dit op te vatten als een colloïdaal-chemisch stelsel van zeer ingewikkelde aard, bestaande uit electrisch geladen, sterk gehydrateerde micellen.

Vele proteïden, als de nucleoproteïden, hebben een overwegend zuur karakter en zijn derhalve als anion aanwezig (het isoëlectrische punt bij lage p_{H}). De graad van dit zure karakter is afhankelijk van de hoeveelheid zure nucleïne, die in de chromatine van de kernen en dus ook der spermakoppen gevonden wordt. Volgens Lillie zouden de laatste zeer dikwijls hoofdzakelijk bestaan uit zure nucleïne in proteïne-vrije combinatie met verschillende organische bazen. Hiermee correspondeert het verschijnsel, dat de chromatine-colloïdale deeltjes negatief zijn geladen.

Doel van het onderzoek.

Het verschil tusschen de twee soorten spermiën is een X chromosoom of dat, hetwelk tusschen een X- en een Y chromosoom bestaat. Het chromatinegehalte is dus niet hetzelfde, de bouw, misschien ook de chemische samenstelling is verschillend, zoodat de

mogelijkheid zou kunnen bestaan, dat deze chemische verschillen tot uiting komen in een verschil in elektrische lading van deze twee soorten van kiemcellen. Ten einde dit vraagstuk op te lossen hebben wij gebruik gemaakt van de electrophorese, waarbij we dus de invloed nagaan, welke een geladen deeltje (spermatozoïd) in een medium gedispergeerd ondervindt, wanneer we hierin een elektrisch veld aanbrengen.

De studie van de spermatozoïden hebben we dus gezien van een zuiver chemisch oogpunt uit om zodoende te trachten physiologische verschillen in de beide soorten aan te toonen; maar we hebben hierbij de biologische achtergrond niet uit het oog verloren, dat we n.l. steeds te doen hebben met levende organismen, die niet alleen een samenvoeging van chemische deeltjes zijn, maar een harmonisch geheel vormen, waarvan we het levensmechanisme nooit zullen kennen.

Literatuuroverzicht.

Door de studie van verschillende onderzoekers was reeds vastgesteld, dat het meerendeel der tot nu toe bestudeerde ééncellige organismen en cellen, negatief geladen zijn en in een elektrisch veld geplaatst zich naar de anode toe bewegen. Enkele hadden zich ook bezig gehouden met de vraag der elektrische lading van de spermatozoïden. Lillie was de eerste die dit onderwerp ter hand nam. Zoo onderzocht hij de spermatozoïden van *Rana esculenta* in een oplossing van $n/4$ rietsuikeroplossing (isotonisch met physiologische NaCl-oplossing) onder een dekglasje, door de elektroden direkt te plaatsen in de suikeroplossing. De zaadcellen vertoonden een actieve beweging in de richting van de + pool. De snelheid van alle was gelijk en steeds dezelfde. Volgens Lillie waren deze eigenschappen van de spermatozoïden zoo constant, omdat alle dezelfde chemische samenstelling, grootte en structuur zouden hebben. De losse spermakoppen bewogen zich ook naar de anode. De leucocyten gingen in beide richtingen verlopen. De gevolgtrekking van Lillie was, dat de colloïdale deeltjes met veel nucleairchromatine een negatieve lading dragen en de cellen met veel cytoplasma (weinig chromatine) daarentegen een positieve.

Het behoeft geen betoog, dat deze onderzoekingen van Lillie niets bewijzen, daar de verschillende stroomingen, die hier ontstaan, niet uit elkaar zijn te houden.

K u w a s h i T o m i t o berichtte, dat de spermïën van verschillende dieren en van den mensch, gesuspendeerd in aqua destillata, al of niet met 6 % glucose, zich verplaatsten naar de anode. Hij gaf niet aan of deze zaadcellen leefden. Volgens hem was de kataphoresesnelheid van de roode bloedlichaampjes het grootste, dan die van de spermatozoïden en het minste die van de bacteriën.

v. S z e n t G y o r g y i onderzocht ook de kataphoretische beweging van spermïën van muizen. De kiemcellen hadden een anodische beweging. Over een eventueel leven van deze, na het inschakelen der stroom, werd niet gesproken.

Toen wij in begin 1933 onze onderzoekingen begonnen, konden we geen literatuur meer vinden, welke betrekking had op dit onderwerp.

In de laatste twee jaren zijn er echter van Russische zijde verschillende publicaties verschenen. In U.S.S.R. wordt momenteel veel over spermatozoïden gewerkt in verband met de artificieele inseminatie.

Een artikel, dat ons in de eerste plaats interesseerde, was dat van K o l z o w (of K o l s o v, of K o l l t z o f f) en zijn medewerkster S c h r ö d e r, dat als voorloopige mededeeling geplaatst was in de Izwestija 1933, (gerefereerd in het Vlaamsche Geneeskundig Tijdschrift 1933).

K o l z o w gaat ook uit van de veronderstelling, dat de spermatozoïden mét (de vrouwelijke) en zónder het X-chromosoom (de mannelijke) verschillende electriche lading kunnen hebben. Hij liet een electriche stroom gaan door een verdunde oplossing van konijnensperma en zag een deel hiervan zich richten naar de anode en het overige deel naar de kathode. De zaadcellen behielden hun activiteit. Na het experiment werden drie voedsters met deze spermïën kunstmatig geïnsemineerd. Eén voedster werd bevrucht met het deel, dat genomen werd van de anode en bracht 6 vrouwelijke vruchten ter wereld. Het konijn met de kathode-portie bevrucht, wierp 5 jongen, 4 mannelijke en 1 vrouwelijke. Het konijn, dat met het deel tusschen de beide electroden in werd bevrucht, wierp 2 mannelijke en 2 vrouwelijke jongen. De eenige „fout" volgens K o l z o w was de geboorte van het vrouwelijke fetus van het moederdier, dat bevrucht was met de kathode-portie. Dit werd verklaard door de moeilijke scheiding van het sperma na de stroomdoorlating.

Verder laat K o l z o w ons geheel in het duister omtrent de me-

thode van onderzoek, stroomsterkte, milieu der spermieën enz. (In hoeverre spelen eventueele p_H veranderingen aan an- en kathode een rol?).

Eigen onderzoek.

Onze onderzoekingen zijn verricht met runder- en konijnensperma.

Methode van onderzoek.

Het rundersperma verkregen we met behulp van een kunstmatige vagina (methode als in Rusland toegepast), zooals reeds eerder is beschreven.

Het konijnensperma was lastiger te verkrijgen. Verschillende methoden werden toegepast. De eene, was een voedster enkele keeren achter elkaar te laten paren met verschillende rammen en daarna de inhoud uit de vagina te verzamelen. Hierbij was de kans voor verontreiniging met vaginaal- en uterussecretum echter zeer groot. Een andere wijze, was de toepassing van een kunstmatige vagina. Het beste voldeed ons echter de abdominale castratie (te prefereren boven de scrotale) en de testikel met epididymis en een deel van de ductus deferens in de verdunningsvloeistof van het sperma te leggen. Direkt daarna werd het caput en cauda epididymidis en ductus deferens op vele plaatsen ingesneden. We zagen het sperma als een melkachtige wolk te voorschijn komen. Om verontreiniging met eventueele weefseldeelen te ontgaan, filtreerden we de verkregen suspensie door een steriele, zijden doek, terwijl bloed zooveel mogelijk werd vermeden. In op deze wijze verkregen sperma van geslachtsrijpe rammen viel direct op, dat de activiteit van de spermatozoïden van de verschillende rammen lang niet van dezelfde intensiteit was. De eene keer waren deze veel beweeglijker dan de andere keer. (Dit werd eveneens waargenomen bij het sperma van verschillende stieren).

Wanneer we een druppeltje sperma namen van de sneevlakte van een testis en we bezagen dit direkt microscopisch na de insnijding in een hangende-druppelpreparaat, zoodat de aanraking met de atmosferische lucht zoo gering mogelijk was, dan bemerkten we meestal (niet altijd) in het begin geen beweging. Wachtten we daarentegen even (toetreden van lucht) of voegden we een weinig van de bufferende vloeistof toe, die we als suspensievloeis-

stof wilden gebruiken (zie later) of een 4—6 % glucose- of dextroseoplossing of een weinig warme (37°) „Ringer”, dan zagen we bij verschillende zaadcellen, maar lang niet bij alle, beweeglijkheid optreden. Bij toevoeging van suiker is de activiteit zeer intensief. Mettenleiter kon de testikelspermatozoïden met 5 % dextrose of „Ringer” niet tot beweging brengen.

Volgens de nieuwste inzichten hebben de spermïën in de testikel geen beweging. Na de insnijding zou deze ontstaan onder invloed van lucht, lymfhe, bloed en weefselvocht (Redenz en Hirokawa). Spermïën uit het caput epididymidis vertoonden ook meestal in het begin geen, of een heel langzame beweging. We konden deze echter in hooge mate opwekken door toevoeging van de gebezigde buffers als verdunningsvloeistof met glucose (dextrose) of saccharose. Wanneer we de spermïën uit de cauda epididymidis of uit de ductus deferens namen, zagen we meestal direkt en bij de rest die zich eerst niet bewoog, na één minuut, zonder toevoeging van een suspensievloeistof, een activiteit optreden, die echter met een suikeroplossing sterk te verhoogen was. Misschien moeten we dit verklaren door een eventueel groote activeerende werking van het weefselvocht van dit deel der epididymis, dat door de inkerlingen uit de ductus epididymidis vrij komt, of dat de zaadcellen in dit deel reeds geheel klaar zijn voor de bevruchting. Het verschil in de beweging van de spermïën naar gelang van de plaats in het afvoerende apparaat is alzoo misschien een verschil in „rijpheid”. Volgens een mededeeling van Hirokawa zou de epididymis een stof afscheiden, die evenals het prostaatvocht (Redenz) stimulerend op de beweging der spermïën werkt. Volgens Redenz berust deze werking van het prostaatvocht op het hooge alcali-gehalte ervan.

Verdunningsvloeistoffen.

Het door ons gebezigde sperma van stier en konijn had een zeer hooge concentratie door de zuivere toestand, waarin we het verkregen. Daar we de kataphoretische beweging ook microscopisch wilden bestudeeren, was het onmogelijk door deze groote dichtheid het effect van het aanbrengen van een stroomkring in de sperma-suspensie na te gaan. Derhalve moesten we dit verdunnen. Een eerste vereischte voor deze vloeistoffen was natuurlijk, dat deze de beweging van de spermatozoïden niet gingen remmen en de bewegingsduur niet deden verminderen.

Wanneer men de literatuur nagaat, wordt men getroffen door het vele, dat er op het gebied van de verdunningsvloei-stoffen is gepubliceerd. Vooral is dit in de laatste twee jaren van Russische zijde het geval. Over de beste en meest doelmatige samenstelling staan veelal verschillende meeningen tegenover elkaar. Alle onderzoekers zijn het er echter wel over eens, dat het toevoegen van een bepaalde hoeveelheid suiker aan een zekere zoutoplossing de beweging der zaadcellen in hooge mate bevordert. Kölliker was de eerste, die de gunstige werking van een suikeroplossing op de beweeglijkheid van de spermatozoën beschreef. Rohleder meende dat een 5—10 % suikeroplossing de beste resultaten gaf. Mettenleiter deelt in zijn artikel verschillende verdunningsvloei-stoffen mede. Hij was van oordeel, dat dextrose in een 5 % oplossing het meest gunstige effect had. Dit was veel minder het geval in een hoogere concentratie, zooals b.v. de 10 % ige. Hij kwam tot de slotsom, dat in een zuivere dextrose-oplossing, zonder toevoeging van verschillende zouten, de spermiën zich wel zeer snel bewogen, maar gauwer onbeweeglijk werden dan in andere suspensievloei-stoffen, waarin aan de suikeroplossing wel verschillende zouten waren toegevoegd. Wij kunnen dit ten volle onderschrijven, evenals de mededeeling, dat in een 10 % dextrosesolutie spermiën met groote, geringe of geen beweeglijkheid naast elkander voorkomen.

In het belangrijke werk: „The artificial insemination in the cattle and sheep” van de Russische onderzoekers: Kusnetzowa, Milowanow, Neumann, Nagaew, Skatkin, in 1932 in het Russisch gepubliceerd, vonden we op bladzijde 193 de invloed van verschillende glucose-concentraties op schapenspermiën, door middel van een curve weergegeven, waaruit ook bleek, dat een grootere concentratie glucose schadelijk op de beweging en levensduur werkte. Het beste zou een 6.4 % oplossing zijn. Bij onze onderzoekingen met rundersperma bleek toevoeging van een 0.1 %—5.5% glucoseoplossing aan een bepaalde zoutoplossing de gunstige invloed te hebben.

Redenz kwam na het beëindigen van zijn onderzoek tot de conclusie, dat de beweging der spermiën in anaerobe verhoudingen door glycolyse moest worden veroorzaakt, terwijl onder aerobe voorwaarden glucose de beweging versterkte. Redenz stelde alzoo de glycolyse en glucose verantwoordelijk voor de mobiliteit.

Om de levensduur van konijnen-spermiën, verkregen uit de

cauda epididymidis, te verlengen, voegden Y a m a n e en E g a s h i r e een 3.3 % glucose-oplossing toe, zooals O c h i bij ratten-sperma had gedaan, waarmee deze glucose-oplossing isotonisch zou zijn.

S a t o beval een 5.25 % dextrose- of een 10 % saccharosesolutie aan bij een verdunning van 3 à 4 maal voor paarden-sperma.

S c h r ö d e r en R a m e n s k a j a kregen de beste resultaten door glyocol-bufferende oplossingen te gebruiken. Fosphaat-buffers voldeden volgens hen minder goed. Ook B e d e r k e wees erop, dat een fosphaatbuffer bij honden-sperma, met of zonder dextrose, niet voldeed. De K-ionen, Mg-ionen en Cl' in één suspensie gecombineerd, werkten ongunstig, terwijl Mg-ionen en SO₄" samen heel goed voldeden voor paarden-sperma. De Ca-ionen waren steeds belangrijke componenten voor de verdunning en werkten het beste met de K-ionen in een gelijke verhouding. Volgens S c h r ö d e r en R a m e n s k a j a is de aangewezen oplossing voor het konijnen-sperma:

NaCl	100	} met een glyocolbuffer van een p _H 7.0.
KCl	2	
CaCl ₂	2	

M e t t e n l e i t e r had er ook reeds op gewezen, dat de samenstelling van het milieu met primair- en secundair glucophosphaatmengsels (resp. met KH₂PO₄ en Na₂HPO₄) niet aan het doel beantwoordde. Hij zag hierbij, dat van niet snelbewegende spermien de koppen aaneen kleefden d.w.z. agglutineerden.

M i l o v a n o v en S e l i v a n o v a concludeerden echter, dat glucophosphaatmedia zeer goed bruikbaar waren, dat de kationen als K, Ca en Mg gunstig op het stieren-sperma werkten, terwijl de anionen, behalve de SO₄", minder goed de activiteit der spermien beïnvloedden. Een van de laatste onderzoekers op dit gebied, K i l l i a n, vond, dat een medium, bevattende 0.25—0.5 mol. glucose en gebufferd door fosphaten van een p_H tusschen 7.4—7.8 een zeer goede suspensie vormde.

B e r n s h s t e i n brak een lans voor geïnactiveerd serum (1 uur op 60° C.) als suspensiemiddel voor runder-sperma, dat beter zou voldoen dan minerale verdunningsvloeistoffen.

Daar de Russen veel op dit gebied werken en de voor de kunstmatige bevruchting benodigde verdunningsvloeistoffen, allen bereid in het Veeteeltkundig Instituut te M o s k o w, in Rusland wor-

den gebruikt en als de meest gunstig samengestelde worden beschouwd, lijkt het me gewenscht deze samenstelling voor de verschillende dieren hier mede te deelen. De origineele publicatie is te vinden op blz. 215 van het reeds genoemde Russische werk ¹⁾. (Over de kunstmatige bevruchting bij rund en schaaap zie ook Götz e. Dt. Tierärz. Wochenschrift.)

Glucose-phosphaat verdunning.

	<u>schaap</u>	<u>rund en varken</u>	<u>paard</u>
<u>Oplossing I.</u>			
Glucose (watervrij) in gr.	57.5	54.0	48.7
aqua dest.	aanvullen tot 1000.0	dito tot 1000.0	dito tot 1000.0
<u>Oplossing II.</u>			
KH ₂ PO ₄ in gr.	3.4	3.2	2.9
Na ₂ HPO ₄ + 2 H ₂ O	17.8	16.8	15.2
aqua dest.	aanvullen tot 1000.0	dito tot 1000.0	dito tot 1000.0

Van deze beide oplossingen 20 cc. samenvoegen. De p_H is 7.31.

De volgende vloeistoffen hebben we gebruikt om het sperma te verdunnen:

a. Een mengsel van de volgende zouten:

- 0.80 gr. NaCl.
- 0.02 gr. KCl.
- 0.02 gr. CaCl₂.
- 0.01 gr. MgCl₂.
- 0.10 gr. NaHCO₃.
- 0.005 gr. NaH₂ PO₄.
- 0.100 gr. glucose

op 100 gr. aqua destillata.

Om deze hoeveelheden niet iedere keer te moeten afwegen

¹⁾ Het is mij een aangename plicht den Russischen hoogleeraar Prof. Westenrijck ook hier te danken voor de bereidwilligheid om verschillende gedeelten uit het Russisch voor ons te vertalen.

maakten we gebruik van de volgende twee „standaard” vloeistoffen:

Standaard I:

20 % NaCl.

0.5 % KCl.

0.5 % CaCl₂.

0.25 % MgCl₂.

Van deze oplossingen namen we 4 cc., die we met aqua dest. aanvulden tot 50 cc.

Standaard II.

5 % NaHCO₃.

0.25 % NaH₂PO₄.

Hiervan werd 2 cc. aangevuld met gedestilleerd water tot 50 cc. Voor het gebruik samenvoegen met 50 cc. „Standaardvloeistof I” met 100 mgr. glucose.

De beide vloeistoffen moeten gescheiden bewaard worden, daar er anders een neerslag ontstaat.

b. Het fosphaatmengsel dat Prof. N e u m a n n ons toestuurde uit Moskow, waarvan we de samenstelling oorspronkelijk niet kenden. Dit was alleen bedoeld voor runder-sperma. In een later ontvangen publicatie werd de samenstelling bekend gemaakt en reeds door ons aangegeven als glucose-fosphaatverduunning voor varken en rund.

c. Fosphaatbuffer met 4.5 %—5.5 % glucose. Het mengsel was samengesteld uit secundair- en primair-fosphaat van S ö r e n s e n met glucose. De fosphaatoplossingen zijn, met door koken van CO₂ bevrijd gedestilleerd water, bereid. De soluties waarvan we uitgingen waren: $\frac{1}{15}$ mol. primair kaliumfosphaat (9.078 gr. KH₂PO₄) in 1 Liter oplossing en $\frac{1}{15}$ mol. secundair natriumfosphaat, (11.876 gr. Na₂HPO₄ 2 H₂O) in 1 Liter.

d. Fosphaatbuffer met 0.10 % glucose.

e. Fosphaatbuffer door middel van 0.10 n. HCl op een lagere p_H gebracht.

f. Glycocolbuffer (amido-azijnzuur). Deze is bereid volgens de standaardoplossing van S ö r e n s e n. Opgelost: 0.1 m. glycocol + 0.1 n NaCl (7.505 gr. glycocol + 5.850 gr. NaCl) per Liter en toevoeging van 0.1 n HCl of 0.1 n NaOH.

g. Glycocolbuffer met 0.1 % tot 5.5 % glucose.

Voor het nagaan van de bewegingsrichting der spermïën, hebben we gebruik gemaakt van twee methoden, de micro- en macroscopische. Bij de eerste, bestudeerden we de electrophoretische beweging aan de spermïën zelf, bij de tweede, beoordeelden we deze in de grenslaag tusschen verdunningsvloeistof van de spermïën en spermasuspensie. Deze laatste methode, diende ook om zoo mogelijk het sperma te scheiden in het mannelijk en vrouwelijk vormende deel.

Het spreekt vanzelf, dat we om de beweging van de zaadcellen te behouden, deze heel voorzichtig behandelden en de toestellen vóór iedere proef pijnlijk reinigden, daar de spermïën heel gauw op uitwendige invloeden van allerlei aard reageeren.

Microscopische methode.

Hiervoor benutten we twee systemen.

a. de micro-kamer voor kathaphorese.

Deze methode is ook door Walter Kross en Margarete Zuelzer bij de studie over spirochaeten gebruikt.

De sperma-suspensie brachten we in een ruimte, die gevormd werd door een dun voorwerp glas, waarop aan weerszijden in de lengterichting twee smalle, dunne glaasjes, door middel van vaseline goed bevestigd waren. Tusschen deze beide druppelden we een weinig sperma-suspensie. Over deze beide reepen glas werd een dekglasje gelegd, dat op dezelfde wijze hierop werd vastgekit met canadabalsum of vaseline. De dikte van de glasreepjes bepaalde zoo de diepte van de verkregen kamer. Wij gebruikten een dikte van 0.45 m.M.

Wanneer we nu metaalelectroden in de suspensie plaatsten en er een stroom doorheen lieten gaan, kregen we een gasontwikkeling, electrolyse, aan de beide polen. Om deze te voorkomen, werd gebruik gemaakt van onpolariseerbare elektroden. De beide openingen der kamer werden met vloeibare KCl-agar (3%), die spoedig stolt, gesloten. Er heeft zich zoo een gesloten kamer gevormd, zonder luchtbellens. De ruimte met het verdunde sperma werd onder de microscoop gelegd en de stroomdoorlating geschiedde via twee KCl-agarheveltjes¹⁾, waarvan het eene been rustte in de KCl-agar,

¹⁾ Deze heveltjes waren rechthoekig omgebogen glasbuisjes van ± 2 m.M. doorsnede, waarvan het eene been langer was dan het andere. Na verwarming werden de buisjes gevuld met een warme oplossing van verzadigde KCl met 3% agar; vervolgens werd zoo lang gewacht tot de massa gestold was. We moesten er steeds voor zorgen, dat aan het einde van het heveltje geen retractie van de agar ontstond, waardoor we een storing in de stroomgeleiding zouden kunnen krijgen.

die de kamer afsloot en het andere in een 10 % CuSO_4 bad, dat in verbinding stond met de stroombron.

b. Microcuvette, als in photo 1 is aangegeven.

We gebruikten eerst een microcuvette afkomstig van het laboratorium van prof. dr. B u n g e n b e r g d e J o n g uit Leiden, welwillend door prof. dr. K r u y t aan ons afgestaan, waarmee we in het van 't Hoff-laboratorium werkten. Deze berust op het zelfde principe als in photo 1 is aangegeven, maar mist de beide bogen g en h.

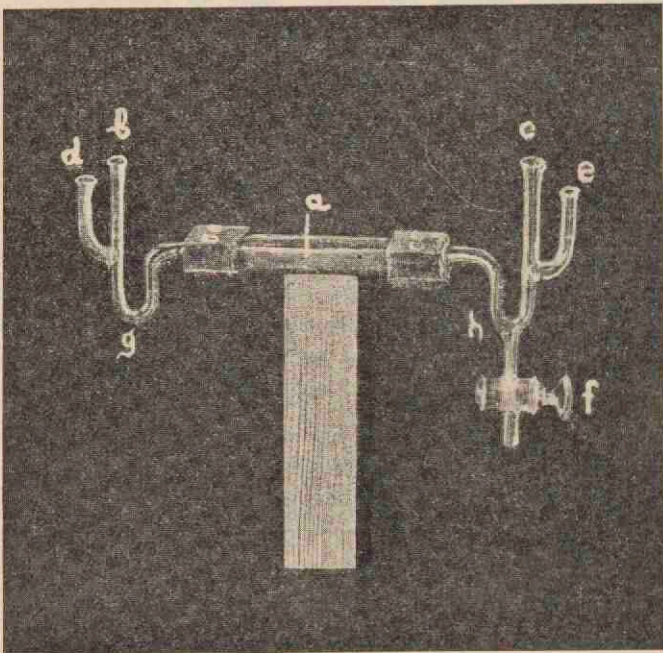


Photo 1.

De aangegeven cuvette, die op de tafel van een microscoop zuiver horizontaal wordt geplaatst, bestaat uit een microkamer a, met een diepte van 0.7 m.M. (zie fig. 5). De bodem is vastgekit op een glasplaat; aan de einden voor de stevigheid met een koperen omraming voorzien. Deze 8 c.M. lange, smalle, ondiepe kamer is aan weerszijden verbonden met een glazen buis, die bij g en h een sterke boogvormige arm vertoont en dan overgaat in de verticale einden b en c.

De buisjes d en e eindigen blind aan deze recht opstaande deelen.

Op de aanrakingsplaats is een platina draad gesmolten, die in het lumen van de verticale buisjes uitsteekt en in dat van d en e, die met kwik gevuld zijn, waarin de beide platinapolen van de stroom-

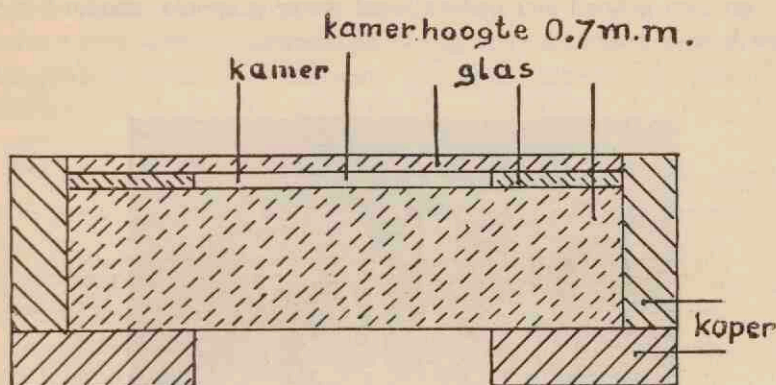


Fig. 5.

kring worden geplaatst. De afstand van het midden van g tot dat van h is 15.5 c.M., die van de electroden 17 c.M.

Het geheel wordt gevuld met het verdunde sperma. De inhoud is 4 c.M.³ van de linker electrode tot de rechter. Men doet het beste het toestel in een schuine houding te vullen, daar er anders luchtbelletten in de vloeistof blijven. De kraan f dient om de suspensie gemakkelijk uit het toestel te verwijderen en het schoon te maken.

We werkten eerst zonder de boogvormige deelen g en h en plaatsten de electroden in b en c. Hierbij ondervonden we veel stoornissen door de gevormde electrolyseproducten van de electrolyt-rijke verdunningsvloeistoffen, die zich dadelijk met de sperma-suspensie mengden, een andere p_H van het milieu veroorzaakten en de beweging der spermieën remden. Deze methode bleek derhalve als zoodanig onbruikbaar te zijn. Gasvormige electrolyseproducten verschenen zelfs wel in het gezichtsveld. De aangebrachte verandering, nl. het aanbrengen van de U-vormige tusschenstukken g en h, bleek een groote verbetering. De secundaire electrolytische producten zakten in de bogen en in de 30 à 40 minuten, dat de stroom werd doorgezonden, stoorden deze niet, daar ze de micro-kamer niet bereikten.

Macroscopische methode.

Hiervoor gebruikten we de macro-cuvette (zie photo 2).

Het verschil met de vorige is o.a. dat we hier de beweging der

spermiën niet direct microscopisch kunnen volgen. Het verdunde sperma werd in de ruimte beneden de beide kranen a en b gebracht via f en g. Daarna werden de beide kranen gesloten en de verticale buizen f en g goed met gedestilleerd water gespoeld, zoodat boven a en b geen spermiën meer aanwezig waren.

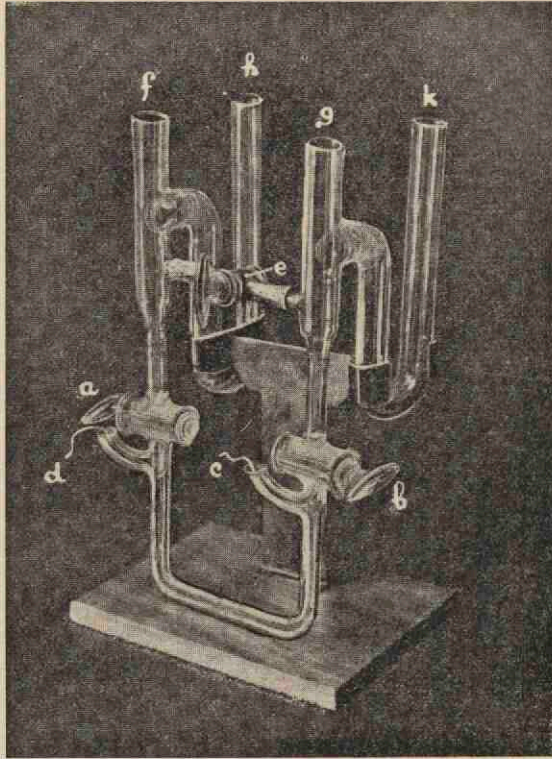


Photo 2.

De buisjes c en d eindigen blind en bevatten naar het lumen toe een in het glas gesmolten platina draad. Zij werden met kwik gevuld. De ruimten boven de gesloten kranen a en b, tot een zekere hoogte in h en k, vulden we met de verdunningsvloeistof van het sperma. Kraan e stond hierbij open om het niveau in de beenen h en k gelijk te krijgen.

Deze cuvette is van onpolariseerbare platina-electroden voorzien. De beide polen werden in h en k geplaatst en met de stroombron verbonden. De secundaire electrolytische producten kwamen in de tijd, die we gebruikten om de stroom door te laten gaan in

h en k en in het groote, diepe verbindingsstuk tusschen deze beide en f en g en niet bij de sperma-suspensie. We hebben nu geen last van de door de polarisatie ontstane electrolytische producten.

Het toestel werd horizontaal geplaatst. We openden na de vulling zeer voorzichtig de beide kranen a en b en zorgden er voor, dat geen strooming en menging optraden tusschen de dispersievloeistof en de sperma-suspensie. Daarna sloten we kraan e en lieten de stroom doorgaan.

De afstand der beide kranen is 8 c.M. en de inhoud van het hoekig gebogen stuk tusschen deze is 5 c.M³. De electroden, die zich direct onder de kranen bevinden, dienen om tijdens de proef de stroomspanning zoo dicht mogelijk bij de grens verdund sperma—verdunningsvloeistof te meten.

In het begin gebruikten we als stroombron anode batterijen van 100 Volt spanning of een accumulatorenbatterij.

In het van 't Hoff-laboratorium werd de stroom van het lichtnet genomen (gelijkstroom) en de gewenschte spanning verkregen door middel van het inschakelen van verschillende lampen en een weerstand-schuifbank. Het potentiaalverschil werd op een voltmeter afgelezen.

In het Veeteeltkundig Instituut verkregen we het vereischte electromotorische vermogen door aansluiting op de lichtleiding (wisselstroom). We plaatsten tusschen het stopcontact en het toestel een plaatstroomapparaat.

In de stroomkring werd een mavometer geschakeld, die als voltmeter en milli-ampèremeter kan worden gebruikt.

Verschillende spanningen werden toegepast om het effect hiervan op de spermiën na te gaan.

Zooals we reeds opmerkten wenschten we ook te weten hoe groot het spanningsverschil gedurende de proef was zoo dicht mogelijk bij het grensvlak suspensie—dispersievloeistof in de macro-cuvette. Dit trachtten we te bereiken door deze te meten aan de platina electroden c en d onder de kranen a en b. Om bij de meting van dit potentiaalverschil geen polarisatie op te wekken en zoo min mogelijk stroom af te leiden, wat een nauwkeurige meting ten goede komt, is het wenschelijk gebruik te maken van de z.g.n. compensatie methode (schakeling van P o g g e n d o r f f). Bij deze schakeling wordt de potentiaal gecompenseerd door een bekende electromotorische kracht, zoodat er geen stroom door gaat. Als nul-instrument deed een zeer gevoelige kwadrant-electrometer dienst.

Gang van het onderzoek.

We gebruikten, zooals reeds is medegedeeld, voor onze experimenten het sperma van stier en konijn. Het eerste, dat met behulp van een kunstmatige vagina werd opgevangen, verdunnen we 5, 16 of 25 maal. Het konijnen-sperma werd meestal verkregen (zie vroeger) door het insnijden van een bepaald deel der epididymis (1 of 2) in 10 c.M³. verdunningsvloeistof. De toevoeging van suiker in een concentratie van 0.1 % tot 5.5 % aan de dispersievloeistof, had een activeerende invloed op de beweging der spermïën. Bij een hogere concentratie zagen we, dat verschillende een zeer snelle, andere een heel trage, min of meer schokkende beweging vertoonden. Wij gebruikten glucose, ofschoon de invloed van de diose saccharose, op de zelfde lijn kan worden gesteld.

De verdunningsvloeistof werd, in navolging van de Russische onderzoekers, toegevoegd aan het sperma en niet omgekeerd. Het verdunde sperma vertoonde een lichte troebeling, al naar de aard en verdunningsgraad.

We werkten bij verschillende temperaturen. Voor dit doel werd de microscoop in een kamertje gebracht, waarin we de temperatuur naar believen konden regelen; diffuus licht werd zooveel mogelijk vermeden.

Na het verkrijgen van het sperma, werd het direct microscopisch onderzocht op beweeglijkheid, ook na de verdunning en zoo spoedig mogelijk in het elektrische veld gebracht.

De beweging der spermïën onder invloed van een electromotorische kracht (E.M.K.) werd eerst nagegaan met behulp van de micro-cuvette of micro-kamer.

De p_{H} van de suspensie sperma—verdunningsvloeistof in de eerste serie proeven, lag tusschen 6.8—8.2. De waterstofionenconcentratie werd electrometrisch vastgesteld met behulp van de glaselectrode.

Wanneer men het verdunde sperma voor de eerste keeren, vooral in een zwak electrisch veld, microscopisch beziet, is het lastig een zuiver oordeel te vormen over de bewegingsrichting van de vele spermïën, die men in het gezichtsveld waarneemt. Door het vele microscopische onderzoek van de bewegingen krijgt men pas een goede kijk op de zoo moeilijk te beoordeelen gedragingen der zaadcellen. Routine is hier van het grootste belang, want dan ziet men verschillen, die niet bij een enkelmalig bekijken of een vluchtige blik worden opgemerkt.

Wanneer we de microscoop op de gevulde, geheel door glas begrensde kamer instelden, voordat de gelijkstroom werd ingeschakeld, zagen we de spermïën zich in de meest verschillende elkaar kruisende richtingen voortbewegen. Daarnaast was waar te nemen, dat hier en daar enkele in trillende beweging waren of kalm om de lengte-as draaiden. Deze beide laatste werden spoedig onbeweeglijk en kwamen niet meer van hun plaats.

Daarna gingen we over tot het aanleggen van een electricch potentiaalverschil aan de electroden en beoordeelden de invloed hiervan op de beweging van de kleine organismen.

Indien we nu allereerst de micrometerschroef zoo draaiden, dat we de laag juist onder de bovenwand van de kamer zagen, was het volgende waar te nemen. We merkten hier zeer dicht tegen de glaswand aan een duidelijke stroom, gaande van de anode naar de kathode. Deze vloeistofbeweging maakte zich natuurlijk aan ons kenbaar door tusschenkomst van de microscopisch zichtbare deeltjes. Stelden we de microscoop dieper in, dan zagen we de bewegingsrichting omkeeren, om bij nog dieper instellen nog eens van teeken te verwisselen in de buurt van de onderste glaswand van de kamer. Dit was het gevolg van electro-endosmose. Het meerendeel der spermïën in de lagen, boven en beneden, direct tegen de cuvetwanden, plaatste zich met de kop tegen de richting van de stroom in, een enkele gelukte het in het begin er tegen in te „zwemmen”. We moeten het phenomeen van dit vloeistoftransport na het aanleggen van het electricch potentiaalverschil aan de electroden als volgt verklaren.

Men heeft in de grenslaag glas-medium een electriche dubbel laag, waarbij de vloeistof positief t.o.v. het glas is geladen. Indien nu een gelijkspanning wordt aangelegd, kan de vaste glaswand met de hieraan geadsorbeerde ionenlaag niet bewegen; derhalve wordt de binnenste laag, de naar de vloeistof gekeerde, wel bewogen en neemt de vloeistof met zich mede. De vloeistofstromingen moeten natuurlijk terugkeeren, wat geschiedt in de middelste lagen van de kamer, waar ze zich vereenigen tot een tegenstroom, gericht naar de anode.

De boven gesignaleerde anodische beweging in het midden was dus hoofdzakelijk vloeistofstroming.

Het is duidelijk, dat de vloeistofbeweging, bij een vluchtig bezien, tot een verkeerde beoordeeling aanleiding kan geven. De spermïën lijken positief of negatief geladen, afhankelijk van de instelhoogte.

Wat men waarneemt, is de superpositie van vloeistofbeweging en eigen beweging van het spermatozoïd ten opzichte van het dispersiemiddel.

Theoretisch is afgeleid voor een cuvet van zeer groote lengte en breedte, dat de electro-endosmotische beweging bij $\frac{1}{5}$ en $\frac{4}{5}$ kamerdiepte door een nulpunt gaat. De juiste waarde is voor elke reële cuvet weer anders. Daar wij de som van electro-endosmotisch transport en kataphorese waarnemen, vinden we dus de zuivere kataphorese alleen op die ($\frac{1}{5}$ en $\frac{4}{5}$) diepten. Door middel van de micrometerschroef hebben we bij onze cuvet kunnen vaststellen, dat de zichtbare beweging bij $\pm \frac{1}{5}$ en $\pm \frac{4}{5}$ kamerdiepte van richting omkeert. Dank zij de geringe kataphoresesnelheid (in vergelijking met de vloeistofbeweging) blijft het omkeerpunt in de buurt van die hoogten. De moeilijkheid werd echter weggenomen door een gelukkige omstandigheid. Wanneer we namelijk onze blik gericht houden op de vloeistoflaag langs de beide wanden, valt ons spoedig op, dat de eerst zeer duidelijke kathodische beweging verdwijnt. Deze langzame wijziging van de electro-endosmose is niet toe te schrijven aan een trage instelling van de potentiaalstroom aan het glas, want het is bekend, dat deze zich in de eerste oogenblikken zeker voor ruim 90 % instelt. De verklaring van dit feit, meenden we dan ook in het volgende te moeten zoeken.

Het is bekend, dat vele lyophile colloïden na eenigen tijd een glaswand bedekken. In een cuvet heeft dit ten gevolge, dat de electro-endosmose nu bepaald wordt door dezelfde potentiaal-sprong als die van de deeltjes.

Deze langzame wandmetamorphose is de oorzaak van het door ons waargenomen verschijnsel. Het stroomingsbeeld verandert hierdoor totaal. Er zijn geen omkeerpunten meer. Bij de wand staan de deeltjes stil en naar het midden toe bewegen ze zich steeds sterker. In ons geval wordt het dus onverschillig op welke hoogte we waarnemen om het ladingsteeken vast te stellen. Wanneer we nu de spermieën in tegengestelde richting zien bewegen, beteekent dit wel degelijk een tegengesteld ladingsteeken.

We bepaalden ons nog steeds eerst bij een p_H 6.8 tot 8.2 van de sperma-verdunning en een temperatuur die tijdens de proef constant bleef tusschen 10° — 18° C.

Wanneer nu de gelijkstroom werd ingeschakeld, zagen we in de as van de kamer der door ons gebezigde toestellen, in het begin, bij een lage voltage niets bijzonders; de bewegingen van de sper-

miën schenen beneden ± 25 volt in de microcuvet en beneden ± 10 volt in de gesloten microkamer niet veranderd te zijn. Indien de spanning daarna echter langzaam werd verhoogd, namen we het volgende waar.

Onder het verhoogde voltage zagen we alle onbeweeglijke spermïen naar de anode gaan, de beweeglijke verplaatsten zich in beide richtingen; maar na eenige routine was waar te nemen, dat er bij b.v. 35 volt in de microcuvette, méér naar de positieve dan naar de negatieve pool gingen. Hoe grooter de spanning werd, des te vlugger verplaatsten zich de „dooide” naar de positieve pool en des te duidelijker was het verschijnsel, dat er veel meer levende een anodische, dan een kathodische beweging bezaten. De overgrootte meerderheid van de levende gedroeg zich als zijnde negatief geladen.

We konden over het algemeen zeggen, dat tusschen 25 tot 50 volt in de microcuvet de „dooide” reeds langzaam naar de anode gingen; pas in de buurt van ± 50 volt bewogen zich meer levende naar de positieve dan naar de negatieve.

Zooals men weet, is de bewegingssnelheid van een deeltje in een electricch veld bij een constante temperatuur, recht evenredig met het potentiaalverval in de kamer, d.w.z. met het spanningsverschil tusschen de beide electroden gedeeld door hun afstand, met de lading van het deeltje, met de diëlectrische constante van het medium en omgekeerd evenredig met de viscositeit van de suspensievloeistof.

De „lading” van het gesuspenderde deeltje moet men bezien als een electriche dubbellaag, een potentiaalverschil tusschen deeltje en milieu en niet als een vrije electriche lading. Het „buitenbelegsel” van die dubbellaag is diffuus te denken (atmosfeer) en gedeeltelijk beweeglijk ten opzichte van de wand. Bij een spanning van 110 volt zagen we een zeer duidelijke anodische beweging van de onbeweeglijke spermïen. Ook de levende gingen in hoofdzaak naar de anode, de andere naar de kathode. In de buisjes buiten de kamer en in de bogen g en h vormde zich naar mate de spanning grooter was, een verdichting van de suspensie aan de anode en een opheldering van de spermasuspensie aan de kathode.

Dit is hierdoor te verklaren, dat de meeste spermatozoën, evenals de meeste eiwitten van het sperma-serum, die bij deze zuurgraad een negatieve lading zullen hebben als de meeste proteïnen, naar

de positieve pool gaan. Volgens vele onderzoekers vertoonen de meeste eiwitten in een electrisch veld bij de genoemde p_H 's een uitgesproken anodische beweging. Deze bezitten derhalve een overwegend zuur karakter bij deze waterstofionenconcentratie, terwijl de dissociatie van de alkalische kant wordt onderdrukt.

In de macro-cuvet hebben we de beweging als volgt trachten te bestudeeren. Voor het gemak nemen we in het vervolg aan, dat de positieve electrode steeds is geplaatst in het been k en de negatieve in h. De kraan b noemen we derhalve de positieve kraan en a de negatieve. Na het sluiten van de stroomkring gingen we steeds op bepaalde tijden door middel van capillair uitgetrokken glazen buisjes na, hoe de spermïën zich hadden verplaatst aan de grensvlakten sperma-suspensie—suspensievloeistof, boven de kranen a en b, via de vertikale buizen f en g. Het verkregen druppeltje, uit de vloeistof juist boven de scheiding sperma-verdunningsvloeistof, werd direct in een hangende druppelpreparaat microscopisch onderzocht, om de dichtheid en de beweging der spermïën te beoordeelen.

P o y a r k o f f heeft aangetoond, dat het gebruik van capillaire buizen, die niet op een voorafgaande manier behandeld zijn, tot valsche conclusies aanleiding kunnen geven. Volgens deze schrijver kan het alkali van het glas een invloed op de beweging der deeltjes uitoefenen. Voor de biologische studie van de spermïën werden de buisjes derhalve eerst goed uitgekookt, om het alkali te verwijderen. Onnoodig te zeggen, dat we onze toestellen ook zoo veel mogelijk van dit euvel hebben trachten te bevrijden.

In de macro-cuvette zagen we ook weer het geringste effect bij het inschakelen van een zwakke stroom. Bij een spanning van 50 volt bemerkten we echter een duidelijke tendenz van de zaadcellen om naar de positieve kraan te gaan; maar veel sprekender bijv. bij 100 volt. We namen dan n.l. macroscopisch na eenige tijd een ophelderen waar van de sperma-suspensie aan de kant van de kathode (onder kraan a) en een zeer opvallende suspensie-verdichting bij de positieve kraan (b) onder en boven. Bekeken we bij deze spanning een druppeltje microscopisch, dan viel direct op, dat boven kraan a weinig spermïën waren in verhouding met de andere kant, maar die er waren, waren beweeglijk. Een heel enkele keer zagen wij een onbeweeglijke. Bij kraan b (onder en boven) namen we heel iets anders waar. Hier vonden we een hoeveelheid doode spermïën en heel weinig levende in de bovenste lagen in de macros-

copisch reeds zichtbare verdichting, terwijl in de onderste vele levende en weinig onbeweeglijke aanwezig waren.

Hoe langer de stroom doorging, des te meer onbeweeglijke vonden we aan de kant van de positieve pool.

In deze proef heerschte, indien in de macro-cuvette, gevuld met het sperma van rund of konijn en verdund door middel van de vloeistof a. (zie vroeger) of een glucose-buffer met een p_H 6.8—8.2, een stroom passeerde met een spanning van 110 volt en een stroomsterkte van 3 à 4 m.Amp., een spanning van 32—40 volt aan de elektroden c en d.

De beweeglijkheid van de spermieën in de macro-cuvette tijdens de stroomdoorgang, konden we met het volgende voorbeeld demonstreeren:

Runder-spermieën werden in de samengestelde verdunningsvloeistof a., verdunningsgraad 1 : 5, gesuspendeerd. De beweging was uitstekend. Bij een stroomspanning van 110 volt, een stroomsterkte van 4 m. Amp. en een p_H van het verdunde sperma van 7.98 (glas-electrode) bij 18° C. gaf, na een kwartier bij de positieve kraan (b) vele beweeglijke en enkele onbeweeglijke spermieën. Na drie kwartier waren er boven kraan b vele beweeglijke, terwijl het aantal onbeweeglijke ook was vergroot. Door de laag van onbeweeglijke spermieën heen bewogen zich vele levende. Na anderhalfuur bevonden zich bij kraan a (de negatieve kant) alleen beweeglijke; boven kraan b nam het aantal „doode” toe evenals dat der levende in de meer hieronderliggende lagen. Na verloop van twee en een half uur vonden we bij b vele „doode” en verscheidene levende. Na drie en een half uur namen de onbeweeglijke sterk in aantal toe, terwijl de levende minder actief werden. Na vijf en een half uur konden we nog vele levende boven de positieve kraan aantonen, maar waren veel minder vitaal dan aan het begin van de proef. Bij kraan a waren ook levende waar te nemen maar veel minder in aantal dan bij kraan b en practisch geen onbeweeglijke.

Wel is waar moeten we opmerken, dat na zoo'n groot tijdsverloop de electrolyse-producten uit de beenen h en k stoorden. We namen soms inderdaad na twee uur aanmerkelijke p_H veranderingen waar, boven de positieve en negatieve kraan. Bijv.:

Verdunningsvloeistof:	p_H 6.05
Sperma	p_H 6.51
Sperma 1 : 5 verdund	p_H 6.09

Spanning 110 volt.

Na $1\frac{1}{4}$ uur boven de „positieve kraan” p_H 6.07.

Na $1\frac{1}{4}$ uur boven de „negatieve kraan” p_H 6.09.

Ander voorbeeld:

Verdunningsvloeistof: p_H 8.36.

Sperma p_H 6.35.

Sperma 1 : 6 verdund p_H 7.35.

Spanning 110 volt.

Na twee uur boven de „positieve kraan” p_H 6.92.

„ „ „ „ „ „negatieve kraan” p_H 8.46.

Deze proeven hebben we vele malen herhaald en het bleek, dat de eene keer de spermiën veel meer bestand waren tegen de invloed van een E.M.K. dan de andere keer. Bij verschillende onderzoekingen waren alle zaadcellen practisch na twee uur onbeweeglijk, soms zelfs reeds na anderhalf uur, bij een spanning van 110 volt en gesuspenseerd in de samengestelde vloeistof *a.* of in een van de buffers.

Hoe hooger de spanning, des te sneller werden de spermiën onbeweeglijk. Zoo waren in verdund runder-sperma 1 : 16 met phosphaatbuffer als verdunningsvloeistof, p_H 7.31, de zaadcellen na één uur in een spanning van 240 volt practisch onbeweeglijk, terwijl daarentegen in een andere spermavloeistof, in een stroomkring geplaatst langzaam opklimmend tot 300 volt, nog wel beweeglijke aanwezig waren. Soms werden ze onmiddellijk onbeweeglijk na het inschakelen van direct 220 volt. Een vaste regel was echter niet aan te geven.

Verder interesseerde het ons bij het gebruik van vloeistof *a.* op welk tijdstip na het aanleggen van het electrisch-potentiaalverschil, aan de electroden chloor in het been *g* was aan te toonen, als de positieve electrode in *k* was geplaatst, bij een spanning van 120 volt. Het bleek, dat bij een verdunning van 1 : 5 we in staat waren na ruim 4 uur met behulp van een capillair uitgetrokken buisje en jood-kalistijfselpapier de positieve Cl-reactie in het been *g* bij de verbinding met de iets schuinlopende dwarsbuis, te verrichten.

Tot nu toe bespraken we slechts de gedragingen der zaadcellen in een milieu, al of niet met glucose, met een p_H , schommelende tusschen 6.8—8.2 en vonden we een overwegend aantal spermiën met een anodische en een gering aantal met een kathodische beweging.

We hebben daarnaast ook een serie onderzoeken verricht, waarbij het sperma gebracht werd in een milieu met een hoogere zuurgraad om de uitwerking hiervan op de zaadcellen na te gaan. We gebruikten hiervoor de genoemde buffers met glucose.

Indien we de p_H van het milieu beneden een zeker punt verlaagden, bemerkten we, dat de beweging van de spermïën zwakker werd; ze waren minder actief dan bij een p_H in de buurt van 7. De snelheid, waarmee ze zich voortbewogen naar de polen toe, was dan min of meer geremd. We mochten wel zeggen, dat we over het algemeen geen verschil in beweging zagen bij de runderspermïën in vergelijking met de eerstgenoemde serie proeven, indien we bleven boven p_H 5.3 en wat de konijnen-spermïën betreft boven p_H 5.6. Deze getallen golden echter in geen deele voor alle sperma-monsters. Soms zagen we nl. bij de runder-spermïën reeds een duidelijke zwakkere beweging bij p_H 5.8 of pas bij p_H 4.8. Ten opzichte van het konijnen-sperma konden we hetzelfde zeggen. Een scherp omschreven getal was hier niet aan te geven.

Wel viel het ons op, dat de gewone activiteit beter bewaard bleef in een glucose-glycolbuffer, dan in een glucose-phosphaatbuffer.

Indien we hier spreken van de zuurgraad, wordt er mede bedoeld die van het mengsel: sperma — suspensievloeistof en niet van de laatste alleen.

Wat gebeurt als de zuurgraad van het mengsel nog meer wordt verhoogd?

Bij het verlagen van de p_H konden we op een gegeven oogenblik zoowel microscopisch als ook in de macro-cuvet, constateeren, dat de spermïën als het ware uitvlokten. In het begin vereenigden zich twee of drie zaadcellen, later verscheidene; ze kleefden veelal, niet altijd, met de koppen aan elkander, vertoonden een schokkende beweging of een langzaam draaien om de lengte-as en gingen daarna stil liggen. Onder invloed van de aangelegde spanning verplaatsten ze zich niet; ook niet indien we deze verhoogden tot 300 volt. In de macro-cuvette vormde zich macroscopisch geen laag spermïën boven de positieve „kraan” zooals bij een hoogere p_H ; ook microscopisch na het nemen van een druppeltje met een capillair uitgetrokken buisje boven de kranen, konden we geen spermïën vaststellen. Het eigenaardige was, dat niet alle spermatozoën direct aan elkaar koppelden en onbeweeglijk werden; enkele bewo-

gen zich nog wel in het begin; bij een spanning van ± 100 volt een enkele keer nog wel 10 minuten.

De p_H waarbij we dit verschijnsel van agglutinatie waarnamen, schommelde om 4.5 bij de runder-spermiën en 4.7 bij de konijnspermiën. Het was echter bij de verschillende sperma-monsters niet steeds hetzelfde getal. Zoo zagen we het van runder-sperma wel optreden bij p_H 5.08 (eenige malen) of pas bij 4.2. Dit punt noemen we het iso-electrische punt.

Indien we de p_H van het mengsel sperma — suspensievloeistof nog meer verlaagden, viel ons op, dat de uitvloeking grooter werd, de spermiën groote ophooping, conglomeraten vormden en zoo aaneengekleefd, onder invloed van de E.M.K., naar de negatieve pool gingen. In de macro-cuvette zagen we ook duidelijk boven de negatieve kraan een groote hoeveelheid uitgevlokt, geagglutineerd sperma ontstaan.

We bevonden ons nu onder het iso-electrische punt; de spermiën waren omgeladen en vertoonden een kathodische beweging. Verder konden we constateeren, dat hoemeer we ons van het iso-electrische punt verwijderden, de beweging naar de negatieve pool sneller werd.

Een voorbeeld van drie sperma-monsters van denzelfden ram kan dit misschien verduidelijken.

- a. p_H verdund sperma 3.71. Uitgevlokt, gaat snel naar de kathode;
- b. p_H verdund sperma 4.02. Uitgevlokt, veel minder snel naar de kathode;
- c. p_H verdund sperma 4.68, gaat naar de anode en is niet uitgevlokt. De spermiën leven goed.

Het iso-electrische punt was hier niet aan te geven.

De lading wordt dus minder hoe meer we het iso-electrische punt naderen.

Schröder deelde in 1933 (gerefereerd in *Animal Breeding Abstracts*) zijn conclusies mede over het effect van een E.M.K. op paarden- en konijnsperma. Na drie, respectievelijk twee uur stroom van 110 volt door een verdunde spermaoplossing te laten gaan, dat in een U-vormige buis was gebracht, zag zij de meeste nog leven. Bij een p_H 4.10 waren de paardenspermiën positief geladen; bij een p_H 7.0 en 7.8 gingen ze naar de beide polen. Konijnspermatozoïden gingen bij p_H 4.5 naar de kathode en tusschen p_H 6.5 tot 7.3 naar anode en kathode en waren zeer actief.

Volgens Keller zou het spermatozoïde een negatief geladen

voorhoofdsband bezitten, een positief geladen oppervlakte-laag, terwijl de staart overwegend + geladen zou zijn.

Resultaten.

Keeren we nu terug naar onze opgave om uit te maken of er verschil in lading zou bestaan tusschen de mannelijk en vrouwelijk vormende spermatozoën, dan is het wel te begrijpen, dat we moeten werken in een milieu, dat ligt in de buurt van p_H 7.5, daar we hier microscopisch een verschil in lading kunnen waarnemen van de spermieën zonder nevenverschijnselen; in elk geval moeten we zijn boven het iso-electrische punt.

We gebruikten voor deze serie onderzoeken het zuiver gewonnen konijnensperma uit de epididymis. Dit werd verdund en gebracht onder de kraan a en b van de macrocuvette, terwijl er boven alleen de suspensievloeistof was. De spanning, waarbij we werkten, was ± 110 volt en de duur van stroomdoorgang van een half- tot één uur, zooals is aangegeven in de tabel op blz. 92-93. Na dien tijd werden de kranen a en b gesloten, het deel juist boven elke kraan onderzocht op beweeglijkheid (leven?) en daarna bij verschillende voedsters artificieel geïnsemineerd.

Voordat we tot de kunstmatige bevruchting overgingen, lieten we de bronstige voedster met een door vasectomie gesteriliseerde ram copuleeren, ten einde ovulatie tot stand te doen komen. ¹⁾

¹⁾ De experimenten in de laatste jaren genomen hebben namelijk aan het licht gebracht, dat er bij de konijnen een nauw verband is tusschen de copulatie en de ovulatie.

Iwanoff dacht eerst uit zijn proeven te moeten concludereen, dat bij alle zoogdieren de ovulatie geschiedde zonder een voorafgaande copulatie. Uit de latere onderzoeken bleek het konijn echter zeer slecht kunstmatig bevrucht te kunnen worden.

Heape en Küpfer wezen er toen het eerst op, dat bij verschillende zoogdieren de ovulatie niet spontaan geschiedt, maar de stimulans van de copulatie noodig heeft. Yamane en Egashira konden dit bevestigen, waarbij zij vonden, dat bij de kunstmatige inseminatie zonder voorafgaande steriele copulatie 8.3% werden bevrucht (Hammond en Asdell vonden 3.6%) en met een voorafgaande steriele dekking 62.5%. De stimulans van de copulatie is dus wel niet strikt noodzakelijk om de ovulatie te inducereen, maar wel gewenscht om de artificieele inseminatie effectief te maken.

Walton en Hammond kwamen na het beëindigen van hun onderzoeken bij het konijn tot de conclusie, dat de follikelbersting in het algemeen begint 10 uur na de coïtus; de follikels bersten echter niet alle gelijktijdig.

Wij lieten de steriele copulatie verrichten door een gevastectomeerde ram,

Tabel 36.

Tijd van de steriele copulatie	Tijd van de inseminatie	Aanduiding voedster	Aantal gebruikte epididymidis	pH verdunde sperm suspensie	Buffer
8 uur 10 8 uur 20	18 uur 18 uur	No. 954 No. 996	samen twee	7.42 7.42	glycocol met 0.2 % glucose
9 uur 9 uur	18 uur 10 18 uur 10	No. 993 No. 967	samen twee	7.56 7.56	glycocol met 0.1 % glucose
8 uur 30 8 uur 50	17 uur 20 17 uur 20	No. 928 No. 959	een	7.18 7.18	phosphaat met 4 % glucose
8 uur 20 8 uur 20	18 uur 40 18 uur 40	No. 910 No. 916	een	7.36 7.36	phosphaat met 5.5 % glucose
10 uur 10 uur 40	19 uur 10 19 uur 20	No. 943 No. 946	samen twee	7.27 7.27	glycocol met 2 % glucose
7 uur 30 8 uur 20	17 uur 17 uur	No. 982 No. 921	samen twee	7.28 7.28	phosphaat met 1 % glucose

De voor deze proeven gebezigde voedsters hadden tevoren alle reeds een keer geworpen.

Bij de kunstmatige bevruchting is de intra-uterine methode toegepast. Enkele schrijvers beweren, dat inseminatie bij lichaamstemperatuur het beste is. Wij injecteerden het verdunde sperma met behulp van een 10 c.M. lange, dunne, gummi-katheter, waarop een 2 c.M.³ inhoudende glazen spuit was geplaatst. Het gelukte bij bronstige dieren gemakkelijk de cervix te passeeren.

Uit het overzicht van de rangschikking der proeven mogen we,

waarbij deze door middel van onderbinding en resectie van een deel van de ductus deferens steriel was geworden, terwijl de geslachtsdrift behouden bleef. Wij verrichtten deze operatie bij vier rammes onder locale anaesthesie en aseptische voorzorgen. Het beste voldeed ons de abdominale methode. Na de gewone aseptische cautelen, openden we de buikholte bij het op de rug liggende dier in de mediaanlijn. We meden zodoende het „scrotum” en het manipuleeren aan den testikel. Het vas deferens werd bilateraal op twee plaatsen onderbonden en voor alle zekerheid het stukje tusschen de beide ligaturen gereserceerd (\pm 2 c.M.) en de testikel zooveel mogelijk in het „scrotum” gelaten. We zorgden ervoor, dat geen bloedvaten in de onderbindingen werden opgenomen. De proefcopulaties van deze dieren waren steriel. Ze ejaculeerden wel een vloeistof, maar geheel vrij van zaadcellen. De rammes vertoonden in hun gedragingen geen verschil met fertiele.

Temperatuur waarbij de inseminatie geschiedde	Voltage en duur van stroom-doorlating	Ampèrage	Spermaportie	Ingespoten hoeveelheid	Duur der graviditeit	Bevrucht	Verhouding der fetus	
							♂	♀
16° C.	110 Volt 1 uur	3 m.A.	+ pool - pool	1 cc. 1 cc.	— —	neen neen		
12° C.	110 Volt 1 uur	3 m.A.	+ pool - pool	1½ cc. 1½ cc.	31 dagen —	ja neen	3	1
18° C.	120 Volt 1 uur	4 m.A.	+ pool - pool	1 cc. 1 cc.	32 dagen —	ja neen	5	4
15½° C.	110 Volt ¾ uur	3 m.A.	+ pool - pool	1½ cc. 1½ cc.	32 dagen 31 dagen	ja ja	3 2	5 1
10° C.	100 Volt ½ uur	7 m.A.	+ pool - pool	1 cc. 1 cc.	— —	neen neen		
11° C.	Niet in de stroom geplaatst			1½ cc. 1 cc.	31 dagen 31 dagen	ja ja	3 1	2 6

zoover we het uit dit aantal kunnen, concludeeren, dat de scheiding in twee soorten spermien ten opzichte van de lading, niet in zich houdt, dat dit overeenkomt met de mannelijk en vrouwelijk vormende. Vóór de inseminatie waren steeds de meeste spermien nog in beweging, ofschoon 6 van de 10 voedsters onbevrucht bleven. Waarschijnlijk is derhalve het zich bewegen der spermien niet steeds een criterium voor de vruchtbaarheid van de zaadcellen en kan de elektrische stroom een fatale uitwerking gehad hebben op de bevruchttingsmogelijkheid.

Tabel 36.

Tijd van de steriele copulatie	Tijd van de inseminatie	Aanduiding voedster	Aantal gebruikte epididymidis	pH verdunde spermam-suspensie	Buffer
8 uur 10	18 uur	No. 954	samen	7.42	glycocol met
8 uur 20	18 uur	No. 996	twee	7.42	0.2 % glucose
9 uur	18 uur 10	No. 993	samen	7.56	glycocol met
9 uur	18 uur 10	No. 967	twee	7.56	0.1 % glucose
8 uur 30	17 uur 20	No. 928	een	7.18	phosphaat met
8 uur 50	17 uur 20	No. 959	een	7.18	4 % glucose
8 uur 20	18 uur 40	No. 910	een	7.36	phosphaat met
8 uur 20	18 uur 40	No. 916	een	7.36	5.5 % glucose
10 uur	19 uur 10	No. 943	samen	7.27	glycocol met
10 uur 40	19 uur 20	No. 946	twee	7.27	2 % glucose
7 uur 30	17 uur	No. 982	samen	7.28	phosphaat met
8 uur 20	17 uur	No. 921	twee	7.28	1 % glucose

De voor deze proeven gebezigde voedsters hadden tevoren alle reeds een keer geworpen.

Bij de kunstmatige bevruchting is de intra-uterine methode toegepast. Enkele schrijvers beweren, dat inseminatie bij lichaamstemperatuur het beste is. Wij injecteerden het verdunde sperma met behulp van een 10 c.M. lange, dunne, gummi-katheter, waarop een 2 c.M.³ inhoudende glazen spuit was geplaatst. Het gelukte bij bronstige dieren gemakkelijk de cervix te passeeren.

Uit het overzicht van de rangschikking der proeven mogen we,

waarbij deze door middel van onderbinding en resectie van een deel van de ductus deferens steriel was geworden, terwijl de geslachtsdrift behouden bleef. Wij verrichtten deze operatie bij vier rammes onder locale anaesthesie en aseptische voorzorgen. Het beste voldeed ons de abdominale methode. Na de gewone aseptische cautelen, openden we de buikholte bij het op de rug liggende dier in de mediaanlijn. We meden zodoende het „scrotum” en het manipuleeren aan den testikel. Het vas deferens werd bilateraal op twee plaatsen onderbonden en voor alle zekerheid het stukje tusschen de beide ligaturen gereserceerd (± 2 c.M.) en de testikel zooveel mogelijk in het „scrotum” gelaten. We zorgden ervoor, dat geen bloedvaten in de onderbindingen werden opgenomen. De proefcopulaties van deze dieren waren steriel. Ze ejaculeerden wel een vloeistof, maar geheel vrij van zaadcellen. De rammes vertoonden in hun gedragingen geen verschil met fertiele.

Temperatuur waarbij de inseminatie geschiedde	Voltage en duur van stroom-doorlating	Ampèrage	Spermaportie	Ingespoten hoeveelheid	Duur der graviditeit	Bevrucht	Verhouding der fetus	
							♂	♀
16° C.	110 Volt 1 uur	3 m.A.	+ pool — pool	1 cc. 1 cc.	— —	neen neen		
12° C.	110 Volt 1 uur	3 m.A.	+ pool — pool	1½ cc. 1½ cc.	31 dagen —	ja neen	3	1
18° C.	120 Volt 1 uur	4 m.A.	+ pool — pool	1 cc. 1 cc.	32 dagen —	ja neen	5	4
15½° C.	110 Volt ¼ uur	3 m.A.	+ pool — pool	1½ cc. 1½ cc.	32 dagen 31 dagen	ja ja	3 2	5 1
10° C.	100 Volt ½ uur	7 m.A.	+ pool — pool	1 cc. 1 cc.	— —	neen neen		
11° C.	Niet in de stroom geplaatst			1½ cc. 1 cc.	31 dagen 31 dagen	ja ja	3 1	2 6

zoover we het uit dit aantal kunnen, concludeeren, dat de scheiding in twee soorten spermien ten opzichte van de lading, niet in zich houdt, dat dit overeenkomt met de mannelijk en vrouwelijk vormende. Vóór de inseminatie waren steeds de meeste spermien nog in beweging, ofschoon 6 van de 10 voedsters onbevrucht bleven. Waarschijnlijk is derhalve het zich bewegen der spermien niet steeds een criterium voor de vruchtbaarheid van de zaadcellen en kan de elektrische stroom een fatale uitwerking gehad hebben op de bevruchttingsmogelijkheid.

CONCLUSIES.

Door verandering der zuurgraad in de vagina van konijnen, raten, schapen, varkens en runderen vóór de conceptie met behulp van acidum lacticum- en bicarbonas natricusoplossingen is geen verschuiving van de geslachten der vruchten te bewerkstelligen.

Na artificieele inseminatie bij het konijn met sperma, dat vooraf met glucosehoudende buffers op een lagere (p_H 4.41, 5.05 en 5.23) of hogere p_H (p_H 8.11, 7.98 en 8.36) wordt gebracht, moet eveneens worden geconcludeerd, dat hierdoor geen invloed op de geslachtsverhouding der vruchten is waar te nemen.

De behandeling met bicarbonas natricus, maar vooral die met melkzuur, vermindert de bevruchtungskans.

De p_H in de vagina van konijnen, met behulp van de indicatorenmethode bepaald, is gemiddeld 7.4, met als uiterste grenzen 6.5 en 8.4.

Na eenige ervaring is het macroscopisch niet lastig het geslacht van een pasgeboren konijn bij sectie vast te stellen.

De eenige goede methode om de p_H van het vaginaalsecretum van runderen te bepalen, is die met de glaselectrode.

De p_H van het secretieproduct uit de vagina van een rund is niet op alle plaatsen dezelfde. Zelfs worden er verschillen gevonden van 0.15 p_H .

Onder de p_H van het vaginaalsecretum wordt in het vervolg verstaan het gemiddelde van op drie plaatsen gemeten waarden.

De p_H van het vaginaalslijm van runderen, die in de oestrus verkeren, ligt tusschen 5.54 en 8.86. In de meeste gevallen ligt ze tusschen 7.01 en 8.23.

Ouderdom en ras, evenals voedingstoestand hebben geen invloed op de zuurgraad in de vagina van het rund.

De p_H van de vagina-inhoud van runderen blijft niet constant, maar vertoont dagelijksche schommelingen.

Het secretum van runderen, lijdende aan fluor albus, blijkt een p_H te bezitten liggende tusschen 7.16—8.33.

De zuurgraad van het secretum van runderen, lijdende aan vaginitis infectiosa, ligt tusschen 6.66—7.63.

Het uterus-, cervicaal- en vaginaalsecretum van hetzelfde rund bezitten niet dezelfde p_H .

Voor het verzamelen van sperma van den stier voor biochemisch onderzoek, blijkt het meest geschikt de methode met de kunstmatige vagina.

De stier ejaculeert gemiddeld 4.6 cc. sperma ($2\frac{1}{2}$ —6 cc.).

De p_H van het sperma van den stier ligt tusschen 6.51 en 8.67.

Een 0.1—5.5 % glucose-oplossing aan een bepaalde zoutoplossing toegevoegd, heeft een activeerende werking op runder- en konijnenspermiën.

Om de kataphoretische beweging der spermatozoiden te bestudeeren is het ten zeerste gewenscht gebruik te maken van een micro-cuvet voorzien van boogvormige armen, om de stoornissen door de gevormde electrolyseproducten veroorzaakt, te ontgaan.

Bij het aanleggen van een electricch potentiaalverschil aan elektroden, die geplaatst worden in een micro-cuvet, waarin zich een spermasuspensie bevindt, is dank zij de microscopisch zichtbare deeltjes, in de eerste oogenblikken een duidelijke kathodische vloeistofverplaatsing langs de wanden waar te nemen. Deze verdwijnt echter zeer spoedig. De verklaring van dit feit is te zoeken in de verandering van de aard van de wand. De laatste wordt n.l. bedekt door de deeltjes zelf; dit heeft ten gevolge, dat de electroendosmose nu bepaald wordt door dezelfde potentiaalsprong als die van de deeltjes.

Bij het aanleggen van een spanning van ± 110 volt in een spermasuspensie met een p_H 6.8—8.2, bewegen alle niet-actieve spermatozoiden zich naar de anode. De meeste actieve gaan eveneens naar de positieve pool; enkele echter naar de negatieve.

Het geringste effect treedt op bij de zwakste stroom.

Indien de p_H van het milieu der spermiën wordt verlaagd, neemt

men een zwakkere beweging der zaadcellen waar, na het aanleggen van een electricch potentiaal verschil.

In een milieu van $\pm p_H$ 4.5, respectievelijk 4.7, ontstaat meestal een uitvloeking van de spermiën der runderen, resp. der konijnen. Beneden een bepaalde p_H zijn de spermiën omgeladen.

Verschillende konijnenvoedsters zijn kunstmatig geïnsemineerd met sperma, dat een bepaalde tijd aan een electriche stroom is blootgesteld. Enkele dieren zijn bevrucht met het deel van de kathodezijde, anderen met het deel dat van de zijde der anode is verkregen. Ook hierdoor is geen verschuiving van de geslachten der vruchten te verkrijgen.

LITERATUUR.

- AHLFELD und SCHRAMM. 1872. Die Geburten älterer Erstgeschwängerter. Arch. f. Gynaek. Bd. IV. pag. 510.
- BEDERKE, G. 1933. Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Konservierungsmethoden auf die Vitalität von Hundespermien. Arch. Tierernär. g. Tierz. 9. pag. 585.
- BEHRENS, B. und NAUIJOKS, H. 1925. Der Säuregrad des Scheidensekrets. Ztschr. f. d. ges. Exper. Med. Bd. 47. pag. 178.
- BERNSHTEIN, A. 1933. Problems of artificial insemination. Probl. Zhivotn No. 1. pag. 77. (Geref. in Animal Breeding Abstracts. Vol. 1. No. 2. Juli 1933. pag. 82).
- BETHE, A. 1926. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie. Bd. XIV (1). pag. 337.
- BIDDER, E. 1878. Über den Einfluss des Alters der Mutter auf das Geschlecht des Kindes. Ztschr. f. Geburtsh. und Gynaek. Bd. II, Heft 2. pag. 358.
- BLUHM, A. 1921. Über einen Fall experimenteller Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses bei Säugetieren. Sitz. ber. d. preuss. Akad. d. Wiss.
- 1922. Alkohol und Nachkommenschaft. Ztschr. f. Indukt. Abstamm. und Vererb. lehre. Bd. 28. pag. 75.
- 1923. Weitere Versuche zur Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses bei Säugetieren. Ztschr. f. indukt. Abstamm. und Vererb. Lehre Bd. XXX. pag. 307.
- 1924. Über einige Versuche bei Säugetieren das Zahlenverhältnis der Geschlechter zu beeinflussen. Arch. f. Rassen- und Gesellschafts-Biologie. Bd. 16. pag. 1.
- BROEK, A. J. P. VAN DEN. 1921. Ontwikkelingsgeschiedenis van den mensch. CASE, C. H. 1925. Handling Cases of Sterility in practice. Cornell Vet. 15. pag. 37.
- CLARK, W. M. The determination of hydrogen ions. Sec. Ed.
- COLE, L. J. and JOHANSSON. I. 1933. Sex control again. J. of Hered. D. C. Vol. XXIV. No. 7. pag. 265.
- CUENOT, L. 1899. Sur la détermination du sex chez les animaux. Bull. scient. de France et de la Belgique. Vol. 32.
- DEMME, R. 1927. Bakteriologisch-biologische Studien der in der Vagina vorkommenden Mikroorganismen und ihrer Beziehungen zum Selbstreinigungsvermögen der Scheide. Arch. f. Gynaek. Bd. 129. pag. 913.
- und BALTZER, U. 1927. Biologisch-chemische und bakteriologische Studien des Scheidensekrets im Verhältnis zur Menstruation. Arch. f. Gynaek. Bd. 129. pag. 900.
- DÖDERLEIN, G. 1892. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber.
- DONHAM, C. R. and SIMMS, B. T. 1931. Fertility studies in the bull. J. of Amer. Vet. Med. Ass. Vol. 67. pag. 658.
- DU BOIS, D. 1930. A vacuum tube potentiometer applicable for use with glass electrodes of high resistance. J. Biol. Chem. 88. pag. 729.
- DÜSING, C. 1884. Die Regulierung des Geschlechtsverhältnisses bei der Vermehrung der Menschen, Tiere und Pflanzen. Jenaische Ztschr. f. Naturw. Bd. 17. pag. 593.
- ELEMA, B. 1931. De glaselectrode en hare toepassing voor de bepaling van de waterstofionenconcentratie. Chem. Wkbl. Deel 28, 14 en 15. pag. 1.
- 1932. De bepaling van de oxydatie-reductiepotentiaal in bacteriencultures en hare betekenis voor de stofwisseling. Proefschrift, Delft.

- 1932. Over de verbeterde methode ter bepaling van de waterstofionen-concentratie met voorbeelden van toepassing. Chem. Wkblad. Deel 29. No. 45.
- ELISSAFOFF, G. VON. 1912. Über die Beeinflussung der Elektro-endosmose durch Elektrolyse. Ztschr. f. physik. Chemie. 79. pag. 385.
- FELLNER. 1927. Med. Klin. No. 40 (Zie KOCH).
- FETSCHER. 1924. Zur Frage der Knabenziffer beim Menschen. Dtsch. Med. Wschr. pag. 1445.
- FINCHER, G. M. 1926. Case reports. Four infected bulls. Cornell Vet. pag. 59.
- FIND, A. 1914. Untersuchungen über die Bakterienflora pathologisch veränderte Genitalorgane. Diss. Giessen. pag. 96.
- FOSSBINDER, R. J. 1930. A vacuum tube potentiometer for the determination of the E. M. F. of a high resistance cell. J. Phys. Chem. Vol. 34. pag. 1294.
- FISCHER, E. 1913. Die Rehobother Bastards. Jena.
- FÜTH, H. 1930. Zur Frage der willkürlichen Beeinflussung des Geschlechtes beim Menschen. Münch. Med. Wschr. No. 47, pag. 2014.
- GÄNSSLE, H. 1922. Über Geschlechtsbestimmung und Krieg. Ztschr. f. Geburtsh. und Gynaek. 84. pag. 159.
- GOEHLERT. 1882. Über die Vererbung der Haarfarbe bei Pferden. Ztschr. f. Ethnologie. Bd. 14.
- GOLDSCHMIDT, R. 1920. Mechanismus und Physiologie der Geschlechtsbestimmung. Berlin.
- 1928. Einführung in die Vererbungswissenschaft. Berlin. Springer.
- GOSTIMIROVIC, D. 1929. Bemerkungen zur experimentellen hyperfeminierung. Klin. Wschr. II. pag. 2091.
- 1929. Biol. Zbl. 49. pag. 24.
- 1930. Biol. Zbl. 50. pag. 599.
- GÖTZE, R. 1933. Über die neuen russischen Methoden der künstlichen Besamung bei den Haustieren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. Bd. 41. pag. 801 und 820.
- GRABENSEE. 1898. Illustrierte landw. Ztschr. pag. 332.
- GRÄFENBERG, E. 1918. Die cyklischen Schwankungen des Säuretitors. Arch. f. Gynaek. Bd. 138. pag. 628.
- GRAFF, E. 1922. Über das Geschlechtsverhältnis der Neugeborenen. Mon. schr. f. Geburtsh. und Gynaek. Bd. 58. pag. 65.
- HABER, F. und KLEMENSIEWICZ, Z. 1909. Über elektrische Phasengrenzkraft. Ztschr. f. physik. Chemie. 67. pag. 385.
- HAMMOND, J. and MARSHALL, F. H. A. Reproduction in the rabbit. 78. Edinburgh.
- and ASDELL, S. A. 1926. The vitality of the spermatozoa in the male and female reproductive tracts. Brit. J. Exper. Biol. Vol. 4. No. 2. pag. 155.
- HEAPE, W. 1905. Ovulation and degeneration of ova in the rabbit. Proc. Roy. Soc. London Series B. Vol. 76. pag. 260.
- HARRISON, G. B. 1930. The application of a new type of triode valve to the determination of hydrogen-ions concentration with glass electrodes. J. Chem. Soc. 38. pag. 1528.
- HECKER, C. VON. Über die Geburten bei alten Erstgebärenden. Arch. f. Gynaek. Bd. 7. pag. 448.
- HERTWIG, R. 1912. Über den derzeitigen Stand des Sexualitätsproblems nebst eigenen Untersuchungen. Biol. Zentralbl. 32. pag. 129.
- HIROKAWA, W. 1907. Über den Einfluss des Prostatasekretes und der Samenflüssigkeit auf die Vitalität der Spermatozoen. Biochem. Ztschr. pag. 291.
- HÖBER, R. 1919. Lehrbuch der Physiologie des Menschen.

- HOFACKER, J. O. 1878. Über Eigenschaften, welche sich bei Menschen und Tieren vererben. Tübingen.
- IWANOFF, E. 1907. De la fécondation artificielle chez les mammifères. Extrait des Arch. des Sc. Biol. T. XII. No. 4 et 5. pag. 1.
- JANKE, H. 1888. Die willkürliche Hervorbringung des Geschlechts bei Mensch und Haustieren. 2. Auflage. Berlin.
- JANSSEN, L. W. 1931. Potentiaalmeting van cellen met hoogen weerstand met behulp van een audion. Chem. Wkblad 28, 14. pag. 218.
- 1933. Electriche grensvlakverschijnselen aan glas. Diss. Utrecht.
- JASCKE—SEITZ. 1923. Über Kolpitis. Dtsch. med. Wschr. No. 50. pag. 1514.
- KADEN, H. W. 1921. Untersuchungen über die chemische Reaction des Vaginalsekretes beim Rinde. Diss. Leipzig.
- KELLER, R. 1933. Biochemie der Spermatozoon und Eizellen. Bioch. Ztschr. Bd. 257. pag. 86.
- KESSLER, R. und RÖHRS, H. D. 1927. Arch. f. Gynaek. 129, 3. pag. 856.
- KILLIAN, J. A. 1933. Metabolism of Spermatozoa in Semen. Amer. J. Surg. 19. pag. 76 en pag. 103.
- KING, H. D. 1918. Studies on inbreeding. III. The effect of inbreeding, with selection, on the sex ratio of the albino rat. J. of Exper. Zool. 27. pag. 1.
- KLAATSCH, H. 1890. Über den Descensus testicularum. Morph. Jahrb. Bd. 16. pag. 587.
- KOCH, W. 1934. Über hormonale Beeinflussung der Geschlechtes beim Hunde. Klin. Wschr. No. 4. pag. 141.
- KÖLLIKER, A. 1856. Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit. Ztschr. f. Wissensch. Zoolog. Bd. 7. pag. 211.
- KOLZOW, N. K. 1933. Izwestija. (Ref. in het Vlaamsche Geneesk. Tijdschr. 1933. No. 18, E. GLÜCKEL).
- (KOLTZOFF, KOLZOV) and SCHRÖDER, V. N. 1933. Control of Sex in the Progeny of Mammals. Nature, 131. pag. 329. (Ref. in Animal Breeding Abstracts. April 1933. pag. 53).
- KÖNIG, H. 1919. Die Brunst der Schweine. Dtsch. landw.sch. Tierzucht No. 5. pag. 28.
- KROSS, W. und ZUELZER, M. 1932. Elektrophorese Versuche an Spirochäten. Zbl. f. Bakt., Paras. k. und Infekt. Krh. Bd. 126. pag. 360.
- KRUYT, H. R. 1922. Die Stabilitätsverhältnisse bei lyophilen Kolloïden. Kolloïd Ztschr. 31. pag. 338.
- en DE JONG, H. G. 1922. Kapillarelektische Erscheinungen an lyophilen Solen. Ztschr. f. physik. Chemie. 100. pag. 250.
- 1925. Inleiding tot de Physische Chemie. 2e Druk.
- KÜPFER, M. 1920. Beiträge zur Morphologie der weiblichen Geschlechtsorgane bei den Säugetieren. Denkschr. d. Schweizer Naturforsch. Gesellsch. Bd. 61.
- KUSNETZOWA, N., MILOWANOW, V., NEUMANN, O., NAGAEW, V., SKATKIN, P. 1932. The artificial insemination in the cattle and sheep. (in het Russisch).
- KUWASHI TOMITA. 1927. On the cataphoresis of Bloodcorpuscles, Spermatozoa, Yeast and the Eggs of Parasites. Acta Scholae medicinalis Universitatis Imperialis in Kioto. Vol. IX. Fasc. III. pag. 237.
- LENHOSSEK, M. V. von 1903. Das Problem der geschlechtsbestimmenden Ursachen. Jena.
- LENZ, F. 1924. Biologie und Pathologie des Weibes. Erblichkeitslehre und Rassenhygiene Halban u. Seitz. Bd. 1. pag. 803.

- LEIPOLD, E. 1924. Die Bedeutung des Cholesterin-Phosphatidstoffwechsels für die Geschlechtsbestimmung. Jena.
- LILLIE, R. S. 1903. On differences in the direction of the electrical convection of certain free cells and nuclei. The Amer. J. of Physiol. Vol. VIII. pag. 273.
- MAC. INNES, D. A. and DOLE, M. 1930. The behavior of glass electrodes of different compositions. J. Am. Chem. Soc. 52. pag. 29.
- MAC. PHEE, H. C., RUSSELL, E. Z. and ZELLER, J. 1931. An inbreeding experiment with Poland China Swine. J. of Heredity 22. pag. 393.
- MARSHALL, F. H. A. and HAMMOND, J. 1925. The physiology of animal breeding with special reference to the problem of fertility. Ministry of Agriculture and Fisheries.
- METTENLEITER, M. 1925. Sperma und künstliche Befruchtung bei Mensch und Tier. Arch. f. Gynaek. Bd. 126. pag. 251.
- MILLER, F. W. and EVANS, E. I. 1934. Technic for obtaining spermatozoa for physiological dairy studies and artificial insemination. J. of agric. research. Vol. 48. No. 10. pag. 941.
- MILOVANOV, V. K. and SELIVANOVA, O. A. 1932. Dilutors for sperm. (Ref. in Imper. Bureau of animal genetics Animal Breeding Abstracts. October 1933. pag. 153.
- MIJSBERG, W. A. 1925. Über die Entwicklung der Vagina und des Sinus Urogenitalis bei der Ratte (*Mus Decumanus*) und beim Maulwurf (*talpa Europaea*) nebst allgemeinen Bemerkungen über die Bildung dieser Organe bei den Säugern. Ztschr. f. Anat. und Entw. gesch. Bd. 77. Heft 5—6.
- NAKANONIN, T. und MIURA, H. 1929. Über die Selbstreinigung der menschlichen Scheide. Virchow's Arch. f. Path. Anat. und Physiol. Bd. 273. pag. 496.
- OCHI, S. 1916. Physiological studies on spermatozoon, especially its life-duration. Acta Scholae med. Univ. Imp. in Kioto. Vol. I, Fasc. III. pag. 361.
- PAULI, Wo. Kolloid-chemie der Eiweisskörper.
- PEARL, R. and PARSHLEY, H. M. 1913. Data on sex determination in cattle. Biol. Bull. of the marine biol. lab. Bd. 24. pag. 205.
- 1917. The control of the sex ratio. Annual Report of the Maine agricult. Experim. Stat. Orane Maine 261.
- POSSELT, L. 1914. Beiträge zur Frage der Sterilität der Rinder. Diss. Hannover.
- POYARKOFF, E. 1914. Quelques considérations sur la technique des observations biologiques de spermatozoides. Compt. Rend. Hebdomadaires des Séances et mem. de la Soc. de Biol. T. pag. 690.
- REDENZ—ERNST. 1924. Versuch einer biologischen Morphologie des Nebenhodens I. Archiv. f. mikr. Anat. und Entw. Mechan. Bd. 103. pag. 593.
- 1925. Versuch einer biologischen Morphologie des Nebenhodens. II. Archiv. f. mikr. Anat. und Entw. mechan. Bd. 106. pag. 290.
- 1933. Über den Spaltungsstoffwechsel der Säugetierspermatozoen in Zusammenhang mit der Beweglichkeit. Biochem. Ztschr. Bd. 257. pag. 234.
- REIPRICH, W. 1929. Hyperovarie und gestation. Klin. Wschr. II. pag. 1449.
- 1930. Experimenteller hyperfeminismus. Arch. f. Gynaek. 141. pag. 27.
- RENKERT, O. 1913. Untersuchungen über das Verhalten und die Dauer des Nachweises ejakulierten Spermas vom Stier in der Scheide der Kuh. Inaug. Diss. Stuttgart.
- ROBINSON, Der Einfluss des Adrenalins und Cholins auf die Geschlechtsbestimmung. Zit. nach Lehmann. Archiv. f. Gynaek. 51. pag. 241.
- ROEMMELE, O. 1927—1928. Biologische und physiologische Untersuchungen am Sperma und am Scheidensekret des Rindes im Hinblick auf die künst-

- liche Besamung. Zool. Jahrb. Abt. f. allgem. Zool. und Physiol. Bd. 44. pag. 85.
- ROHLEDER. 1912. Über künstliche Befruchtung u.s.w. Dtsch. med. Wschr. No. 36. pag. 1688.
- ROUX, W. 1895. Über die Bedeutung der Kernteilungsfiguren. Eine hypothetische Erörterung.
- SATO, SH. 1916. On the life-duration of the horse spermatozoen outside of the body. Acta Scholae med. Univ. Imp. Kioto. Vol. I. Fasc. III. pag. 361.
- SCHENK, L. 1898. Einfluss auf das Geschlechtsverhältnis. II. Aufl.
- SCHLECHTER, J. 1882. Die Trächtigkeit und das Geschlechtsverhältnis bei Pferden. Revue für Tierh. k. und Tierzucht. Wien. No. 6—9.
- SCHLEIP, W. 1913. Geschlechtsbestimmende Ursachen im Tierreich. Ergebn. Fortschr. Zool. 3.
- SCHRÖDER, R. 1921. Zur Pathogenese und Klinik des vaginalen Fluors. Zbl. f. Gynaek. Nr. 28. pag. 1350 und Nr. 29. pag. 1398.
- SCHRÖDER, V. 1933. Sperm dimorphism of some mammals. Probl. Zhivotn No. 1. 91. (Ref. in Animal Breeding Abstracts. Vol. 1. No. 2. Juli 1933. pag. 142).
- and RAMENSKAJA, G. 1933. Physico-chemical Analysis in some questions of the physiology of Spermatozoa. Biol. Zhur. 1 No. 5—6. pag. 1. (Ref. in Anim. Breeding Abstr. Vol. 1. No. 24. Jan. 1934. pag. 232).
- 1934. An ion equilibrated solution for rabbit spermatozoa. Biol. Zhur. 1. No. 5—6. pag. 20. (Ref. in Anim. Breeding Abstracts. Vol. 1. No. 4. Jan. 1934. pag. 275).
- SCHULTZE, OSKAR. 1904. Zur Frage von den geschlechtsbildenden Ursachen. Arch. f. mikrosk. Anat. und Entw. gesch. Bd. 63. pag. 197.
- SCHUMACHER und GÜNTHER. 1933. Klinische und tiereperimentelle Untersuchungen zur Frage der willkürlichen Beeinflussung des Geschlechtes. Arch. f. Gynaek. Bd. 1 und 2e Heft. 156. pag. 350.
- SIEGEL, P. W. 1910. Zur Frage der künstlichen Geschlechtsbestimmung. Münch. med. Wschr. No. 15.
- 1916. Zur willkürlichen Geschlechtsbestimmung. Münch. med. Wschr. No. 51. pag. 1787.
- 1916. Bedeutung der Kohabitationstermines für die Befruchtungsfähigkeit der Frau und die Geschlechtsbildung der Kinder. Münch. med. Wschr. 63 (I). pag. 748.
- STADIE, W. C. 1929. An electron tube potentiometer for the determination of pH with the glass electrode. J. Biol. Chem. 83. pag. 477.
- SZENT-GYÖRGYI, A. VON. 1920. Eine mikroskopische Überführungsmethode. Biochem. Ztschr. Bd. 110. pag. 116.
- 1921. Kataphorese Versuche an Kleinlebewesen. Biochem. Ztschr. Bd. 113. pag. 29.
- THURY, M. 1863. Über das Gesetz der Erzeugung der Geschlechter. Leipzig. (Vertaald door von Pagenstecher).
- UHLMANN. 1928. Med. Klin. pag. 1088 (Zie KOCH).
- UNTERBERGER, F. 1930. a. Das Problem der willkürlichen Beeinflussung des Geschlechtes beim Menschen. Dtsch. med. Wschr. 56 (I). pag. 304.
- b. Chemische Beeinflussung von Ei- und Samenzellen. Die med. Welt. No. 23.
- 1932. Geschlechtsbestimmung und Wasserstoff-ionenkonzentration. Dtsch. med. Wschr. 58 (I). pag. 729.
- und KIRSCH, W. 1932. Bericht über Versuche zur Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses bei Kaninchen. Monatschr. f. Geburt. und Gynaek. Bd. 91. Heft 1—2. pag. 17.

- VLOTEN, J. G. C. VAN. 1927. De ontwikkeling van den testikel en de urogenitaalverbinding bij het rund. Diss. Utrecht.
- WALTON, A., HAMMOND, J. and ASDELL, S. A. 1928. On the vitality of the spermatozoon in the male and female genital tracts and outside the body. Verhandl. des I intern. Kongresses 1926 für Sexualforschung. Bd. II 1928. pag. 217.
- WALTON, A. and HAMMOND, J. 1928. Observations on ovulation in the rabbit. the Brit. J. of Experim. Biol. Vol. VI. No. 2. pag. 190.
- WESTER, J. 1921. Eierstock und Ei.
- WILKENS, M. 1886. Untersuchungen über das Geschlechtsverhältnis und die Ursachen der Geschlechtsbildung bei Haustieren. Thiel's Landw.sch. Jahrbücher. Bd. 15.
- WIRZ, P. 1929. Die Wasserstoffionenkonzentration und ihre Bedeutung für die Gynaekologie. Mon.schr. f. Geburtsh. und Gynaek. Bd. 82. pag. 103.
- YAMANE, J. 1921. Studien über die physikalische und chemische Beschaffenheit des Pferdespermas mit besonderer Berücksichtigung der Physiologie der Spermatozoen. J. of the Coll. of agricult. Hokkaido imp. Univ. Bd. 9. pag. 161.
- and EGASHIRA, T. 1925. On the relation of copulation to ovulation in the rabbit as shown by means of artificial insemination J. of the Jap. Soc. of Veter. Sc. Vol. IV. pag. 101.
- and KATO, K. 1928. Über die Wasserstoffionenkonzentration des Spermas beim Pferde und ihr Wirkungsoptimum auf die Vitalität der Spermatozoen beim Pferde und Kaninchen. Ztschr. f. Tierz. und Zücht. biol. C. Kronacher. Bd. XII. Heft 3. pag. 347.
- ZSCHOKKE, E. 1900. Die Unfruchtbarkeit der Rinder, ihre Ursachen und Bekämpfung. Zürich.
- ZWEIFEL, E. 1914. Versuche zur Beeinflussung des Bakteriengehaltes der Scheide Schwangerer durch medikamentöse Spülungen. Mon.schr. f. Geburtsh. 39. pag. 459.

...

18

...

19

...

20

...

21

...

22

...

23

...

24

...

25

...

U
19