Onderzoekingen over de sexueel-endocrine organisatie van Rhodeus amarus en de beteekenis van de legbuistest voor de endocrinologie in het algemeen

Onderzoekingen over de sexueel-endocrine organisatie van Rhodeus amarus ♀ en de beteekenis van de legbuistest voor de endocrinologie in het algemeen.

J. J. DUYVENÉ DE WIT

van den Schreiver

ONDERZOEKINGEN OVER DE SEXUEEL-ENDOCRINE ORGANISATIE VAN RHODEUS AMARUS ♀ EN DE BETEEKENIS VAN DE LEGBUISTEST VOOR DE ENDOCRINOLOGIE IN HET ALGEMEEN

Onderzoekingen over de sexueel-endocrine organisatie van Rhodeus amarus ♀ en de beteekenis van de legbuistest voor de endocrinologie in het algemeen

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van den graad van doctor in de Wis- en Natuurkunde aan de Rijksuniversiteit te Utrecht, op gezag van den Rector-Magnificus Dr. Th. M. van Leeuwen, Hoogleeraar in de Faculteit der Geneeskunde, volgens besluit van den Senaat der Universiteit tegen de bedenkingen van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde te verdedigen op Maandag 26 Juni 1939, des namiddags te 4 uur

door

JOHANNES JACOBUS DUYVENÉ DE WIT
geboren te Velp (Gelderland)

D. B. CENTEN'S UITGEVERS-MAATSCHAPPIJ N.V., AMSTERDAM
DRUK: CALFF & MEISCHKE, AMSTERDAM

AAN DE NAGEDACHTENIS MIJNER OUDERS.

AAN MIJN VROUW, DIE NAAST HET VELE DAT ZIJ ZICH OM MIJNENTWILLE HEEFT ONTZEGD, DE STUWKRACHT IN MIJN WERK IS GEWEEST.

Bij het voltooien van dit proefschrift wensch ik U, hooggeleerde Jordan, Pulle en Westerdijk hartelijk te danken voor de wijze waarop U tot mijn wetenschappelijke vorming hebt bijgedragen. Deze dank geldt ook wijlen Prof. Dr. H. F. Nierstrass en Prof. Dr. F. A. F. C. Went, tot wie ik mij tijdens mijn studietijd steeds bijzonder aangetrokken heb gevoeld. Het heeft mij gespeten, hooggeleerde Koningsberger, niet meer van Uw onderwijs te hebben kunnen profiteeren.

U, hooggeleerde Raven, zeg ik hartelijk dank voor het feit, dat U zich bereid verklaarde mijn promotor te willen zijn. Ook dank ik U voor de belangstelling, welke U reeds aanstonds voor mijn onderzoekingen betoonde, en de voortvarendheid, waarmede U mijn manuscript hebt willen doorwerken. Ik hoop, dat het contact met U, na de beëindiging van dit proefschrift, niet verbroken zal worden.

Bijzondere erkentelijk ben ik Prof. Dr. J. Boeke voor de vaderlijke wijze waarop hij tot twee maal toe mijn belangen bij de Jan Dekker-Stichting heeft willen behartigen. Hem en de verdere bestuursleden dezer Stichting ben ik groote dank verschuldigd voor het verleenen van geldelijke steun ter voortzetting mijner onderzoekingen en voor het in mij gestelde vertrouwen, dat hieruit blijkt.

De veelzijdigheid van het, in dit proefschrift behandelde, onderzoek, maakte het wenschelijk specialistische hulp in te roepen. Voor de verleening hiervan ben ik in de eerste plaats zeer veel verschuldigd aan mijn vriend L. H. Bretschneider, die met buitengewone toewijding en scherpzinnigheid, het histologische gedeelte bewerkte, hetwelk van fundamenteele beteekenis voor mijn werk is geweest.

Vervolgens dank ik mijn broeder, E. Duyvené de Wit en Ir. A. W. F. Middelberg voor hun medewerking op chemisch, Dr. J. Freud voor zijn hulp op endrocrinologisch, J. A. Smit en Mej. M. Miessen voor hun medewerking op mathematisch en Dr. J. de Vink voor zijn raadgevingen op medisch gebied.

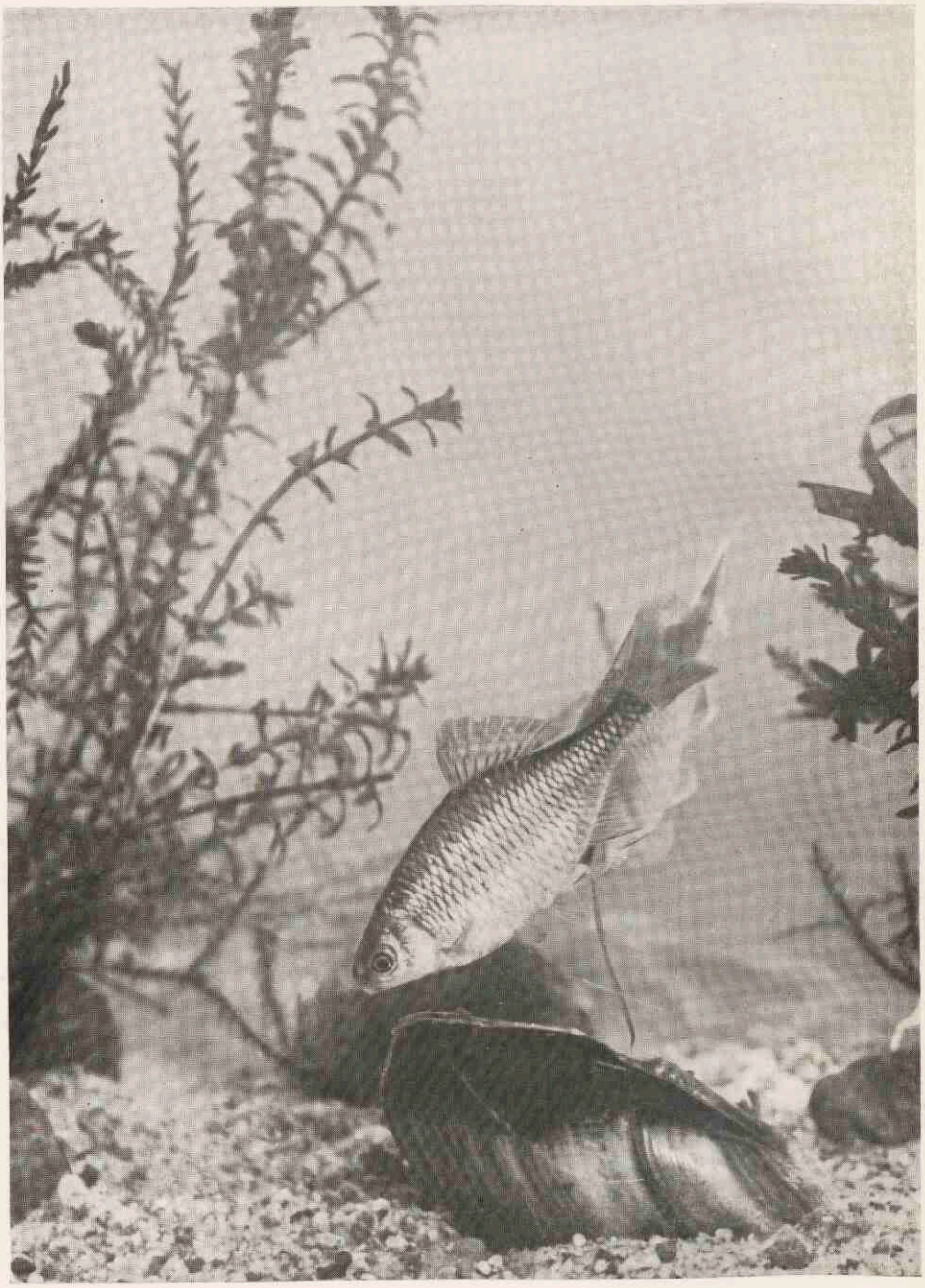
Ook aan allen, die mij van onderzoekingsmateriaal hebben voorzien en wier namen te gelegener plaatse vermeld zijn, betuig ik gaarne mijn dank voor de moeite, welke zij zich hebben willen getroosten.

Tenslotte ben ik nog een woord van dank verschuldigd aan Mej. M. A. Goedewaagen, E. Jaski, E. Langner en N. van Rood, wier medewerking ik in velerlei opzicht mocht ondervinden.

L. H. Bretschneider vervaardigde de linoleumsnede voor de omslag van dit proefschrift en J. Prijs verzorgde de figuren in de tekst.

INHOUDSOVERZICHT.

blz.



Afb. 1. Bittervoorn-paar bij schildersmossel. Copyright Paul Unger.

Afb. 2. Bittervoorn-wijfje in ovipositie. Copyright Paul Unger.

HISTORISCHE ONTWIKKELING VAN HET ONDERZOEK, TEVENS INLEIDING.

Met de legbuisgroei van het vrouwelijke bittervoorntje als hormonale reactie, maakte ik ruim 4 jaren geleden kennis, door middel van een publicatie van Kanter c.s. (1934), (Chicago). Deze publicatie behelst een warme aanbeveling de legbuisreactie voor de diagnose van zwangerschap te gebruiken.

In verband met het practische belang eener snel-uitvoerbare, betrouwbare en tevens niet kostbare zwangerschapsreactie, werd besloten een oriënteerend onderzoek in te stellen naar de bruikbaarheid van de bittervoorn-test voor de diagnose van zwangerschap. Dr. F. C. van Tongeren, gynaecoloog en verloskundige te Amsterdam, verklaarde zich bereid het noodige materiaal (urine van zwangere en niet-zwangere vrouwen) ter beschikking te stellen. De N.V. Koninklijke Pharmaceutische Fabrieken v/h Brocades-Stheeman & Pharmacia gaf mij de proefinstallatie.

Toen het, in weerwil van primitieve proefomstandigheden, gelukte bij 28 gevallen (14 zwangeren en 14 niet-zwangeren) in 75 % een goede uitspraak te doen, leek het de moeite waard de differentiëel-diagnostische waarde van de legbuistest nader te onderzoeken en wel:

a) onder aanzienlijk verbeterde proefomstandigheden,

b) met behulp van een uitgebreider onderzoekingsmateriaal.

De proefomstandigheden konden verbeterd worden door het vaststellen van de optimale voorwaarden. Door invoering van een practisch meetstelsel en de toepassing van eenige kunstgrepen kon de legbuistest voor quantitatieve doeleinden geschikt gemaakt worden.

Doelmatig onderzoekingsmateriaal kon verkregen worden door de restanten van urine's, waarmede de reactie volgens Aschheim en Zondek verricht was, op te vragen. Op deze wijze was het mogelijk de uitkomsten van de legbuistest te vergelijken met die van de reactie volgens A. en Z. en, door een navraag bij de inzenders der urine, bovendien nog te controleeren.

Materiaal werd ter beschikking gesteld door:

Prof. Dr. M. A. van Bouwdijk Bastiaanse, destijds gynaecoloog en verloskundige te Rotterdam.

Dr. B. S. ten Berge, gynaecoloog en verloskundige te Rotterdam.

Dr. L. D. Driessen, gynaecoloog en verloskundige te Amsterdam.

Prof. Dr. J. L. B. Engelhard, hoogleeraar in de gynaecologie en verloskunde te Groningen.

L. A. Falke, assistent in de gynaecologie en verloskunde te 's-Gravenhage.

Prof. Dr. P. C. T. v. d. Hoeven, hoogleeraar in de gynaecologie en verloskunde te Leiden.

M. Mauve, assistent in de gynaecologie en verloskunde te Leiden.

Dr. M. L. Muller, gynaecoloog en verloskundige te Utrecht.

Dr. H. J. M. Plantenga, in leven bacterioloog te Utrecht.

Dr. R. R. Rochat, patholoog-anatoom, bacterioloog, te 's Gravenhage.

Prof. Dr. A. H. M. J. van Rooy, in leven hoogleeraar in de gynaecologie en verloskunde te Amsterdam.

Dr. E. C. van Ryssel, in leven patholoog-anatoom te Rotterdam.

Prof. Dr. K. de Snoo, hoogleeraar in de gynaecologie en verloskunde te Utrecht.

Dr. M. J. E. M. Steyns, gynaecoloog en verloskundige te Utrecht.

Dr. A. J. L. Terwen, bacterioloog te Amsterdam.

Dr. W. Aeg. Timmermann, directeur van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Materiaal van dierlijke afkomst werd ter beschikking gesteld door:

Prof. Dr. F. C. v. d. Kaay, hoogleeraar in de veterinaire gynaecologie en verloskunde te Utrecht.

Dr. J. Siebenga, dierenarts, Oldeberkoop.

Het, vooral door zijn organisatie omvangrijke, onderzoek leverde als resultaat op, dat het in de legbuistest werkzame urine-bestanddeel niet, zooals algemeen werd aangenomen, overeenkomt met een reeds bekend hormoon, doch als een nieuw hormoon(-derivaat) opgevat dient te worden, hetwelk ook gedurende de normale cyclus, dus bij afwezigheid van zwangerschap, uitgescheiden wordt.

De vraag, of de legbuistest bruikbaar zou kunnen zijn voor het aantoonen van zwangerschap moest derhalve veranderd worden in de vraag, of het nieuwe hormoon tijdens de zwangerschap in een zóózeer van de normale afwijkende concentratie wordt uitgescheiden, dat op grond hiervan een diagnose gesteld zou kunnen worden.

Om dit te kunnen beoordeelen werd de uitscheiding der onbekende substantie onderzocht bij een groot aantal zwangere en niet-zwangere vrouwen. Een vergelijking tusschen beide uitscheidingskrommen bracht aan het licht, dat niet-zwangeren op bepaalde tijden van de cyclus een even groote hoeveelheid der betreffende substantie uitscheiden als zwangeren. Op grond hiervan moest geconcludeerd worden, dat de legbuistest onder de gegeven omstandigheden niet geschikt is voor het aantoonen van zwangerschap.

Toen van Kleiner c.s. (1936), (New York) de mededeeling verscheen, dat de legbuisreactie niet door vrouwelijk bronstverwekkend, doch uitsluitend door mannelijk hormoon veroorzaakt wordt, leek het van belang met behulp der verfijnde testmethode nader te onderzoeken voor welk geslachtshormoon de legbuisreactie nu eigenlijk specifiek is.

De hiermede aanvangende tweede phase van het bittervoornonderzoek leidde tot het merkwaardige resultaat dat de legbuisreactie niet alleen door vrouwelijk bronstverwekkend, doch eveneens door mannelijk hormoon, en bovendien door het bij uitstek vrouwelijke corpus luteum-hormoon, ja zelfs door bijnierschorshormoon veroorzaakt kan worden.

Hoe interessant deze bevindingen ook vanuit een algemeen biologisch standpunt zijn, zij waren teleurstellend voor dengene, die meende in de legbuistest een specifieke methode te bezitten, geschikt voor het qualitatieve en quantitatieve aantoonen van een bepaald hormoon.

Er bleef nog slechts één mogelijkheid om de legbuistest voor de

endocrinologie te redden. Deze bestond hierin, te onderzoeken of de wijze van reageeren op de verschillende soorten hormoon misschien specifieke verschillen zou vertoonen.

Het was een groote verrassing toen dit inderdaad het geval bleek te zijn.

Nu bood zich de gelegenheid te onderzoeken hoe de voornaamste vertegenwoordigers der verschillende hormoon-groepen zich in de legbuistest gedragen. De noodige hormoon-preparaten werden ter beschikking gesteld door de volgende personen en instanties:

Prof. Dr. A. Butenandt, directeur der biochemische afdeeling van het Kaiser Wilhelm-Instituut te Berlijn.
Hoffmann la Roche, A. G., Bazel.
Dr. W. Hohlweg, directeur der bio-chemische afdeeling van Schering A. G., Berlijn.
Prof. Dr. E. Laqueur, directeur van het pharmaco-therapeutisch laboratorium der gemeentelijke universiteit te Amsterdam.
Dr. K. Miescher, directeur van de biochemische afdeeling der Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel, te Bazel.
Prof. Dr. T. Reichstein, directeur van het pharmaceutische laboratorium der universiteit Bazel.
Dr. M. Tausk, directeur der N.V. Organon, Oss.

Uitgebreide onderzoekingen brachten aan het licht, dat met behulp van de legbuistest niet alleen de verschillende groepen van hormonen, doch in zekere mate ook de verschillende hormonen zelf, specifieke legbuisreacties geven, op grond waarvan in bepaalde gevallen tot identificatie van een bepaald hormoon kan worden overgegaan.

Meer dan ooit was het thans geboden, behalve de uiterlijk waarneembare veranderingen (legbuisgroei), ook die, welke zich in de visch voltrekken, aan een gedetailleerd onderzoek te onderwerpen. Er kwam een nauwe samenwerking tot stand met L. H. Bretschneider, die het microscopische gedeelte van het Rhodeus-onderzoek voor zijn rekening heeft willen nemen.

In onderlinge samenwerking is de sexueel-endocrine organisatie van Rhodeus amarus geanalyseerd. Zoowel langs de weg der deductie als experimenteel kon worden aangetoond, dat de endocrine organisatie van het bittervoorntje principiëel overeenkomt

met die van het warmbloedige dier. Van essentiëel belang was de ontdekking van corpora lutea in het ovarium van het bittervoorntje en andere visschen. Merkwaardig was de bevinding, dat geen der bij de zoogdieren voorkomende geslachtshormonen en hun derivaten direct op de legbuis inwerkt, doch dat zij alle (via de thalamus opticus?) op de hypophysevoorkwab inwerken. Hierdoor wordt luteïniseerend hormoon afgescheiden, dat corpora lutea in het ovarium doet ontstaan. De corpora lutea scheiden een niet met progesteron identiek hormoon af, dat aansprakelijk is voor de legbuisgroei.

Toen de specifieke legbuisreactie op de voornaamste, bij de zoogdieren en de mensch voorkomende, geslachtshormonen nauwkeurig onderzocht was, opende zich de mogelijkheid de legbuistest in dienst te stellen van de endocrinologie en te trachten bijdragen te leveren op die gebieden, welke door ontbreken van de benoodigde methodiek min of meer ontoegankelijk schenen. Hiermede brak de derde phase van het Rhodeus-onderzoek aan.

In de eerste plaats bleek de legbuistest bijna 100 maal gevoeliger te zijn voor het aantoonen van het corpus luteum-hormoon, dan de gebruikelijke konijnen-test. Wat tot dusver niet mogelijk scheen, n.l. de bepaling van de hoeveelheid progesteron-achtig hormoon in één enkel corpus luteum, kon nu verwezenlijkt worden. Zoowel van dierlijke als van menschelijke corpora lutea werd het gehalte aan progesteron bepaald. Voor de laatstgenoemde kon er een verband worden gelegd tusschen het gehalte aan dit hormoon en de secretorische activiteit.

Menschelijke corpora lutea werden ter beschikking gesteld door:

Prof. Dr. M. A. van Bouwdijk Bastiaanse, voornoemd.
Prof. Dr. H. T. Deelman, directeur van het pathologisch-anatomisch laboratorium te Amsterdam.
Dr. J. A. van Dongen, gynaecoloog en verloskundige te Amsterdam.
Prof. Dr. J. L. B. Engelhard, voornoemd.
M. Mauve, voornoemd.
V. M. Oppers, arts te Amsterdam.
Mej. Dr. J. A. Stroink, assistente in de gynaecologie en verloskunde te Utrecht.

Mevr. Dr. Vandeputte—van Hove, gynaecologe en verloskundige te St.-Amandsberg, Gent.

Dr. J. de Vink, assistent in de gynaecologie en verloskunde te Amsterdam.

Dr. I. A. Wijsenbeek, gynaecoloog en verloskundige te Amsterdam.

Prof. Dr. B. Zondek, geneesheer-directeur van het Rothschild-Hadassah-Hospitaal te Jerusalem.

Ook van een aantal placenta's, ter beschikking gesteld door:

B. J. Bieseman, med. stud. te Amsterdam,

Dr. J. Blomberg, apotheker te 's Gravenhage,

kon het gehalte aan progesteron-achtig hormoon bepaald worden.

In de tweede plaats bleek het mogelijk in bijnierschors-extracten een bestanddeel aan te toonen, dat niet identiek is met de tot nog toe in zuivere vorm verkregen hormonen met bijnierschorswerking. De mogelijkheid is niet uitgesloten, dat dit in de legbuistest werkzame bestanddeel overeenkomt met het eigenlijke, nog niet geisoleerde, bijnierschorshormoon(-complex).

In de derde plaats was het mogelijk de natuurlijk voorkomende en een aantal synthetisch bereide mannelijke hormonen, welke geclassificeerd zijn volgens hun werkzaamheid in de kapoenenkam- en zaadblaastest, ook te rangschikken naar hun werkzaamheid in de legbuistest.

In de vierde plaats was het mogelijk de werkzaamheid der vrouwelijke bronstverwekkende hormonen bij het bittervoorntje en bij het knaagdier te vergelijken.

Hiermede zijn de voornaamste onderzoekingen, op grond waarvan men zich een denkbeeld kan vormen van de beteekenis van het bittervoorntje voor de endocrinologie, aangeroerd.

Tenslotte is gebleken, dat het mannelijke bittervoorntje een geslachtshormoon afscheidt, dat bij het wijfje legbuisgroei kan veroorzaken. Deze waarneming opent nieuwe gezichtspunten voor de sexueele endocrinologie der koudbloedige gewervelde dieren.

HOOFDSTUK I.

DE BIOLOGIE VAN RHODEUS AMARUS.

§ 1. ALGEMEENE GEGEVENS BETREFFENDE HET BITTERVOORNTJE.

Het bittervoorntje (Rhodeus amarus, Bloch) behoort tot de orde der Teleosteï en de familie der Cyprinidae. Vroeger ook wel Cyprinus amarus genaamd, schijnt dit vischje de eenige vertegenwoordiger van het geslacht Rhodeus in Europa te zijn.

De vorm van het bittervoorntje is gedrongen, de rug hoog gewelfd, de mond half-onderstandig, zonder tastorganen aan de mondhoeken. De rugvin bevindt zich recht boven de buikvinnen, is even groot als de aarsvin en hieraan bijna gelijk van vorm.

Sommige organen van het bittervoorntje hebben een vergevorderde graad van ontwikkeling bereikt. Zoo is de darm, die bij aanverwante soorten meestal recht verloopt, of ten hoogste één lus vertoont, spiraalvormig gewonden in niet minder dan 8 windingen. Verder komt bij Rhodeus amarus een urogenitaalpapil voor, die bij het wijfje een aanzienlijke lengte kan bereiken. Zoowel bij het mannetje als het wijfje komen twee urineblaasjes voor, welke hun inhoud via deze papil loozen. Fig. 3 diene ter illustratie.

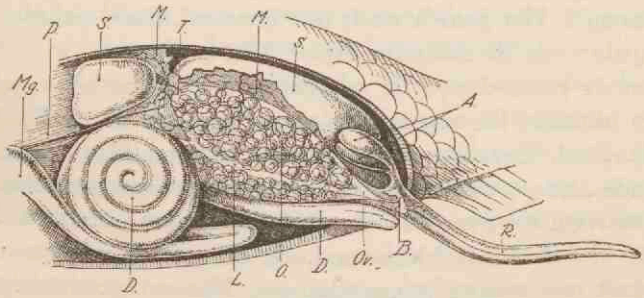


Fig. 3. De ligging der inwendige organen tijdens de paaitijd. De lever is verwijderd. O = ovarium; OV = inwendig oviduct; A = urineblaasjes (door Olt ten onrechte accessorische klieren genoemd); R = legbuis; S = zwemblaas; P = ductus pneumaticus; D = darm. Volg. A. Olt 1893.

Over het algemeen worden bittervoorns niet langer dan 8—9 cm. Zij voeden zich met plantaardig voedsel en allerlei in het water voorkomende dierlijke organismen; het zijn, zooals alle karperachtigen, typische alleseters.

In Japan komen nog twee soorten van een ander geslacht voor, Acheilognathus intermedium, Smithi R. en Acheilognathus rhombeum, Temminck et Schlegel, genaamd.*) Tomizyu Tozawa (1929) en Kikugawa (1937) geven eenige afbeeldingen van deze vischjes, waaruit een gelijkenis met het Europeesche bittervoorntje spreekt.

De levenswijze en de paringsbiologie dezer verschillende soorten bittervoorns schijnt sterk overeen te komen.

Het verspreidingsgebied van Rhodeus amarus strekt zich uit over West-, Midden- en Oost-Europa, benevens over een gedeelte van Azië.

Volgens Duitsche onderzoekers houdt het vischje zich bij voorkeur op in helder stroomend water en bevolkt het de doodloopende zij-armen van de groote rivieren. In Duitschland wordt het zelfs gevonden in de stroompjes van het middelgebergte, zonder dat het een voorkeur voor bepaalde temperaturen aan de dag legt.

In Nederland komt het bittervoorntje voor in vaarten en slooten, waarvan het water zoo goed als stilstaand en weinig helder is. Het blijkt, dat een milieu met een modderige bodem en een rijke vegetatie voor het vischje geen bezwaar uitmaakt.

Intusschen verdienen weinig visschen zoozeer de aandacht van den bioloog-aquariumliefhebber als het bittervoorntje. De geheele paringsbiologie kan in een betrekkelijk klein aquarium worden waargenomen. Het paaien vindt niet eenmaal, doch meerdere malen plaats gedurende de maanden April, Mei en Juni.

Buiten de paaitijd zijn de mannetjes en wijfjes bijna gelijk van kleur en uiterlijk. De rug is grijs-groen van tint en de flanken zijn zilverglanzend. Zeer opvallend, vooral bij kunstlicht, is de groene iriseerende streep, welke zich ter weerszijden van het lichaam, van af de staartvin tot over de halve lichaamslengte, uitstrekt. De vinnen zijn kleurloos tot bleek-rood, de staart- en rugvin aan hun basis bezet met zwarte pigmentkorrels. Het eenige duidelijke ver-

*) Aan Dr. H. C. Redeke ben ik dank verschuldigd voor de inlichtingen, welke hij mij omtrent de exotische bittervoorns verstrekte.

schil tusschen beide geslachten is de oranje vlek vlak boven de zwarte oogpupil van de mannetjes, welke bij de wijfjes slechts in het geel aanwezig is. Ook vertoont het wijfje buiten de paaitijd meestal een aanduiding van de uitwendige legbuis, die caudaal van de anus buiten het lichaam steekt en wel eens gehouden wordt voor een uitwerpsel.

De weinig opvallende kleuren van het mannetje worden in de paaitijd echter geheel overstemd door een schitterende bruiloftstooi, die moeilijk met woorden te beschrijven is en het vischje, wat kleuren betreft, op één lijn stelt met de meest gezochte tropische visschen. Het geheele lichaam van het paailustige mannetje vertoont alle kleuren van de regenboog, waarbij staalblauw en violet de hoofdtoon voeren en de smaragd-groene zijdelingsche strepen nog feller te voorschijn treden. De borst- en buikzijde worden geelachtig oranje tot warm rood, terwijl de rug- en aarsvin dieprood worden en markante zwarte zoomen krijgen. Deze kleuren zijn bij verschillende individuen dikwijls verschillend van intensiteit en wisselen sterk met de „gemoedstoestand" van de visschen, terwijl zij ook ten nauwste verband houden met de heerschende uitwendige omstandigheden, zooals temperatuur, belichting, kleur van de ondergrond enz. Een typisch secundair geslachtskenmerk vormen de z.g. parelvormige organen, die ontstaan als krijtwitte wratjes in hoopjes van 8—13 stuks op de bovenkaak, aan weerszijden onder de neusgaten. Dergelijke wratjes komen ook voor op de bovenste rand der beide oogholten. Ieder parelvormig orgaan is niets anders dan een opeenhooping van dicht op elkaar gedrongen epitheelcellen. Aan het einde van de paaitijd verdwijnen ze onder achterlating van groeven, waaruit bij de eerstvolgende bronstperiode wederom de witte pareltjes ontstaan.

Tomizyu Tozawa heeft onderzocht waar het optreden der schitterende kleuren van het Japansche bittervoorn-mannetje aan toe te schrijven is. Hij vond in de schubben melanophoren, erythrophoren, xanthophoren en guanophoren, waarvan het aantal op verschillende plekken van het lichaam sterk uiteenloopt. In tegenstelling tot hetgeen bij Rhodeus amarus het geval is, verschijnt Acheilognathus intermedium in Japan slechts éénmaal in het jaar in zijn volste pracht en wel tusschen 20 April en 10 Mei. Telt men nu het aantal kleurelementen vóór en tijdens de grootste ontplooi-

ing van de bruiloftstooi, dan blijkt, dat het optreden van de kleurenpracht niet het gevolg is van een toename van het aantal kleurelementen, doch van vormverandering van deze kleurcellen. De melanophoren en erythrophoren vergrooten zich het meest tijdens de bronst. Bij het verbleeken van de visch bevinden zij zich in een toestand van sterke contractie.

Ook bij het mannetje vindt men in de paaitijd caudaal van de anus de urogenitaalpapil, hier als een kleine verhevenheid, die herinnert aan hetgeen men bij het wijfje vindt, welke echter nimmer een lengte van 1 mm overschrijdt.

§ 2. DE LEGBUIS.

Terwijl de wijfjes ook gedurende de paaitijd hun weinig opvallende kleuren behouden en hoogstens wat donkerder worden, ontwikkelt zich de merkwaardige, achter de anus naar buiten hangende ovipositor*), die, zonder de functie ervan te kennen, in 1857 door Kraus werd opgemerkt en door Leydig als een sterk verlengde urogenitaalpapil werd geïdentificeerd. Deze papil is een roodachtige buis, die zich bij het naderen van de paaitijd allengs ontwikkelt, en, wanneer de eieren in de ovaria rijp zijn, als een soms 3—4 cm lange streng vóór de aarsvin vrij in het water hangt. Het oviduct steekt dan een flink eind voorbij de uiterste punt van de uitgestrekte aarsvin.

Ongeveer 60 jaar geleden kon von Siebold zich bij een bezoek aan de vischmarkt te Straatsburg ervan overtuigen, dat deze buis een ovipositor is. Van een groot aantal bittervoorns, dat daar te koop werd aangeboden, stond n.l. een aantal wijfjes op het punt eieren te leggen. De legbuizen, welke toen een reeks van zwavelgele eieren bevatten, hadden hierdoor het aanzien van een parelsnoer.

De functie van het eigenaardige apparaat werd pas veel later duidelijk, n.l. toen het verband werd ontdekt dat bestaat tusschen het bittervoorntje en de zoetwatermosselen uit de geslachten Unio en Anodonta.

Volgens Noll is het voorkomen van visscheneieren in zoetwatermosselen het eerste waargenomen door Cavolini (1787).

*) In de Amerikaansche literatuur wordt de legbuis ovipositor of oviduct genoemd.

Döllinger vond in 1818 visscheneieren in verschillende stadia van ontwikkeling binnen de kieuwbladen van een aantal schildersmosselen uit de Main. Hij gebruikte de embryo's voor de bestudeering van de ontwikkeling van het bloedvaatstelsel, waartoe zij zich uitstekend schijnen te leenen. In 1839 vond Küster een 17-tal eieren in een Unio pictorum; een gedeelte ervan had zich reeds tot embryo ontwikkeld. In 1848 reeds viel het Carl Vogt op, dat de eitjes zeer vroeg uitkomen, zoodat de bescherming van de mossel voor hen wellicht van voordeel is. Aangezien de mosselen geen schade van de eitjes resp. embryonen schijnen te ondervinden, kan men gevoegelijk van een commensalisme spreken.

Er verstreken vele jaren voor men de vischsoort leerde kennen, waarvan de eieren in de mossels werden aangetroffen. Ook werd nog niet begrepen, op welke wijze de eieren in de kieuwlamellen dezer dieren terecht komen. Sommigen schreven de eieren toe aan de rivierdonderpad, hoewel hiervan bekend was dat deze soort haar eieren in nesten deponeert. Von Siebold die in 1863 de eieren uit de schildersmosselen beschreef als gele, ovale vormsels van ongeveer 3 mm lengte en 2 mm breedte, wist nog niet dat deze van het bittervoorntje afkomstig waren.

Aan Noll komt de eer toe voor het eerst verband te hebben gezien tusschen het oviduct, dat door Kraus was ontdekt en de door von Siebold beschreven eieren. In aansluiting op de beschrijving die von Siebold van de eieren geeft, schrijft Noll in 1869:

„Hier haben wir also die in den Muschelkiemen schmarotzenden Eier, die keinem anderen Fische zuerkannt werden konnten, ganz richtig beschrieben. Die Laichzeit des Bitterlings, April und Mai, stimmt ganz genau mit meinen Beobachtungen, und es kann keinem Zweifel unterliegen: der Bitterling ist der Missethäter, welcher der Malermuschel seine Eier zur Aufbewahrung, gewissermassen zum Ausbrüten unterschiebt."

In 1870 kon het exacte bewijs voor de juistheid van deze bewering gegeven worden. Door Dr. Schott, een kennis van Noll, werden dat jaar een 20-tal riviermosselen, die vermoedelijk eieren van visschen bevatten, in een bassin gedeponeerd, waarin geen visschen vertoefden. Nadat de mosselen zich hadden ontdaan van de embryonen, werden zij uit het bassin verwijderd. Er kwam een

school van ongeveer 100 vischjes tot ontwikkeling. Bij nadere beschouwing bleken dit zonder uitzondering bittervoorntjes te zijn.

Het oviduct is dus het apparaat, waarmede het bittervoorntje zijn eieren binnen de kieuwlamellen van de mossel brengt. De vraag dringt zich op, of het teere buisje niet afgeknepen zou kunnen worden bij een eventueel zich sluiten der mosselschelpen. Dat hiervoor geen gevaar bestaat wordt duidelijk, indien men de caudale zijde van een mossel nader beschouwt. Breekt men de soepele, hoornachtige buitenste rand van de schelp op deze plaats af, dan blijkt, dat juist hier de schelpen niet hermetisch sluiten, doch een ovale opening vrijlaten. Indien de mossel, het binnendringen van de legbuis waarnemende, hierop zou reageeren met het sluiten der schelpen, kan dit orgaan dus niet licht beschadigd worden.

§ 3. DE VOORTPLANTINGSBIOLOGIE.

De paaitijd van het bittervoorntje strekt zich uit over April, Mei en Juni. De lust tot paaien treedt vooral aan de dag bij mooi zonnig en warm weer. Tot het leggen van eieren komen alleen die wijfjes, waarvan de legbuis tot de maximale lengte is uitgegroeid. Dit verschijnsel treedt onder normale omstandigheden waarschijnlijk op autonome wijze cyclisch op, zoolang de paaitijd duurt. Sedert J a s k i (1939) gevonden heeft, dat Lebistes-mannetjes een bronstverwekkende stof afscheiden, waardoor de autonome bronstcyclus nog overstemd kan worden, moet men de mogelijkheid in het oog houden, dat ook het mannelijke bittervoorntje een stof afscheidt, die tot plotselinge legbuisverlenging bij het wijfje aanleiding kan geven. (Vgl. hoofdstuk XIV).

Het bronstige, mooi gekleurde mannetje vat meestal post bij één mossel en beschouwt het omliggende gebied als zijn territorium. De grootte van het territorium blijkt verband te houden met de overzichtelijkheid van het gebied (beplanting, bodemformatie, helderheid van het water). Binnen een cirkel van ½—1 m, met de mossel als middelpunt, wordt ieder ander mannetje van zijn soort meedoogenloos weggejaagd. Na het wegjagen van ongewenschte gasten keert het mannetje steeds weer tot zijn mossel terug, plaatst zich af en toe boven de uitstroomopening, met de bek tegen de richting van het uit de sipho stroomende water in, en „waait" hem met de borstvinnen water toe.

Vooral de wijfjes met geheel uitgegroeide legbuizen zoeken uit eigen beweging de mosselen op of worden er door de mannetjes heengejaagd. De maximaal uitgegroeide legbuizen verschillen van de kortere niet alleen door hun lengte, doch ook door hun kleur; ze zijn doorschijnend roze en bezitten groote subepidermale lacunen, welke met lymphe gevuld zijn. Bij de ademopening van een mossel aangekomen, plaatsen het mannetje en het wijfje zich, druk met hun borstvinnen water naar de mossel bewegend, met de koppen eenigszins omlaag. Hun staart bevindt zich aan de zijde van het slot. Plotseling schiet het wijfje eenige cm vooruit, „zwiept" met een korte voortschietende beweging haar legbuis in de uitstroomopening van de mossel. Binnen een onderdeel van een seconde vindt de ovipositie plaats en onmiddellijk hierna zwemt het wijfje weg. Gedurende de ovipositie heeft het mannetje, vlak in de buurt staande, voortdurend sidderende bewegingen uitgevoerd. Deze bewegingen hebben de grootste amplitude bij kop en staart, waarbij een verticaal door de voorste opstaande rugvinstraal als as gedacht kan worden. De veroorzaakte trillingen worden door het wijfje wellicht als ovipositie-prikkel gepercipiëerd en brengen het er misschien toe gemakkelijker tot ovipositie te komen. Zoodra het wijfje is weggezwommen strijkt het mannetje op zijn beurt over de mossel en stort onder hervatting der sidderbewegingen in de grootste kleurenpracht zijn sperma uit.

De foto's op blz. XVII en XVIII stellen eenige momenten uit het paringsspel voor.

Niet na iedere ovipositie wordt sperma in de mossel uitgestort. Ook worden niet zelden eieren in de mossel gedeponeerd onder afwezigheid van het mannetje. Soms wordt een ei gelegd terwijl de legbuis bij toeval buiten de mossel is gebleven. Ook wel wordt de legbuis in de mossel gebracht ofschoon het niet tot ovipositie komt. Tenslotte gebeurt het niet zelden, dat een pas gelegd ei door de mossel wordt uitgestooten. Alle buiten de mossel terechtkomende eieren worden met graagte door de bittervoorns zelf verorberd.

In de literatuur wordt de wijze waarop de legbuis in een dusdanige toestand van verstijving komt, dat deze in de mossel gebracht kan worden, op onvoldoende wijze beschreven. Des-

betreffende waarnemingen hebben het volgende aan het licht gebracht:

Daar waar de ovipositor het lichaam verlaat bevindt zich een ruimte, waarin de afvoerkanalen der beide urine-blaasjes uitmonden, terwijl ook het ovarium zich hierin opent. In deze ruimte kunnen verscheidene eieren gevonden worden. De legbuis zorgt voor afvoer van eieren en urine en is dus een typische urogenitaalpapil. De buis kan nu op twee wijzen een zekere stijfheid verkrijgen: a) door vulling der subepitheliale lacunen met lymphe en b) door vulling van het lumen van de buis met vloeistof (urine of een ander tot dit doel afgescheiden vocht) onder voorbehoud, dat dit niet kan wegloopen, b.v. doordat zich een ei in het lumen bevindt. De gesteldheid van een dergelijke buis kon goed bestudeerd worden bij een visch, waarbij het ei halverwege in de legbuis was blijven zitten. Het gedeelte van de legbuis boven het ovaal-samengedrukte, oranje ei was gezwollen en doorschijnender dan het daaronder gelegen deel. Hieruit viel af te leiden dat het lumen van de buis boven het ei gevuld was met vloeistof. Dit bovenste gedeelte was gestrekt en bezat een zekere mate van stijfheid, die aan het onderste deel ontbrak. Hieruit blijkt, dat de vloeistofvulling van het lumen een wateras vormt, die de buis haar stijfheid verleent. Toen het ei eenige tijd later tengevolge van de hooge druk der omgeving barstte, stroomde behalve de dooier ook de overige vloeistof (urine?) uit de buis. Tegelijk hiermede verdween de gezwollen toestand en werd de buis weer geheel slap.

Bij de ovipositie boven de mossel geschiedt nu het volgende: Zoodra de prikkel tot ovipositie wordt waargenomen, „zwiept" de visch haar legbuis in de richting van de uitstroomopening van de mossel. De slappe legbuis kan niet zonder meer in de spleet terecht komen. Het ei beweegt zich echter zeer snel door de buis en wordt daarbij voortgedreven door de vloeistof, die onder druk (plotselinge contractie der urineblaasjes of van de wand der verzamelruimte?) in de legbuis schiet. Tot daar waar het ei zich bevindt wordt de buis opeens recht en stijf (vorming van de wateras) en dat stijve gedeelte richt zich volgens zijn meest natuurlijke richting naar omlaag en dringt in de spleet van de mossel. Het onderste gedeelte van de legbuis wordt het laatste stijf en geraakt derhalve het laatst, maar ook het diepst in de

mossel. Zoodra het ei uitgestooten is, is de legbuis weer onmiddellijk geheel slap.

Het is P. Unger gelukt eenige momenten uit het paringspel van het bittervoorntje fotografisch vast te leggen. Afbeelding 1 op blz. XVII geeft een bittervoornpaartje in de nabijheid van een zoetwatermossel weer. De lange legbuis is nog dun en slap. Op afbeelding 2, blz. XVIII is de legbuis bijna twee maal zoo dik. Blijkbaar heeft de fotograaf hier juist het moment van ovipositie getroffen. Het ei moet zich aan het einde van de legbuis, dus binnen de mosselschelpen bevinden. De verdikking op de plaats waar het oviduct het lichaam verlaat is waarschijnlijk het gevolg eener fotografisch vastgelegde, snelle beweging.

Nadat de paaitijd voorbij is verbleeken de kleuren van het mannetje en verdwijnt de legbuis van het wijfje nagenoeg geheel.

Belangwekkend is de waarneming van Noll, die in de maand September vier jonge vischjes vond in de kieuwen van eenige vijvermosselen (*Anodonta anatina*). Een ander embryo werd nog in October gevonden. Het schijnt dus, dat het bittervoorntje tegen de winter weer grootendeels gereed is voor de komende paaitijd, hetgeen ook bij histologische beschouwing van het ovarium blijkt (blz. 62 e.v.).

De bittervoorneieren ontwikkelen zich in de goed geventileerde kieuwen der mosselen binnen enkele weken. Naarmate de embryonen bewegelijker worden, oefenen zij waarschijnlijk een grootere prikkelende werking uit op de mossel, waardoor een soort „hoest-reflex" ontstaat. Door de plotselinge krachtige uitstooting van een waterstroom worden de jonge vischjes naar buiten gespoten.

HOOFDSTUK II.

KUNSTMATIG VEROORZAAKTE LEGBUISGROEI, FACTORENANALYSE EN METHODIEK.

§ 1. KUNSTMATIG VEROORZAAKTE LEGBUISGROEI.

In de natuur vindt men de sterk verlengde legbuizen bij het bittervoorntje uitsluitend in de paaitijd. Op andere tijden van het jaar is het oviduct òf in het geheel niet, òf slechts als een klein aanhangel te zien.

Het is Fleischmann en Kann in 1932 gebleken, dat de legbuis ook buiten de paaitijd tot verlenging kan worden gebracht en wel door injectie van follikelhormoon.

In 1933 vonden Ehrhart en Kuhn, dat na toevoeging van een hormoon aan het aquariumwater ook een legbuisgroei optrad. Blijkbaar is de visch tot percutane opname in staat, waardoor het werken met de injectiespuit overbodig wordt.

Geen onderzoeker heeft zich echter bezig gehouden met de uitwerking van een methode, waarmede de legbuisreactie nader geanalyseerd en op haar bruikbaarheid voor endocrinologische doeleinden getoetst kan worden.

Juist deze analyse heeft, zooals later blijken zal, tot verstrekkende gevolgen geleid. Vandaar, dat de factorenanalyse, welke van fundamenteele beteekenis is voor de te ontwerpen testmethode, uitvoerig behandeld dient te worden.

Hieronder zal nu worden nagegaan, hoe de legbuisgroei zich, macroscopisch bekeken, voltrekt en onder welke omstandigheden een zoo duidelijk mogelijk, quantitatief reproduceerbaar effect verkregen kan worden.

§ 2. DE FACTORENANALYSE.

Alvorens tot de eigenlijke factorenanalyse overgegaan wordt, dient de volgende vraag beantwoord te worden.

1) In welke eenheid moet de legbuisgroei uitgedrukt worden?

Bij het onderzoek naar de gevoeligheid van bittervoorntjes van verschillende grootte is gebleken, dat de legbuisverlenging (onder gegeven omstandigheden) ongeveer evenredig met de lengte van de visch is. Daarom is het minder geschikt, als eenheid van verlenging een absolute maat (bijv. 1 mm) te kiezen; in dat geval zouden de lengten der gebruikte visschen n.l. steeds mede vermeld moeten worden. Veel beter kan men een grootheid gebruiken, die in vaste verhouding staat tot de lengte van de visch, want dan worden de legbuisverlengingen van visschen van verschillende grootte door ongeveer gelijke getallen weergegeven. Zoo'n grootheid nu is de lengte van de eerste aarsvinstraal. Deze is inderdaad ongeveer evenredig met de totale lengte van de visch, en kan gemakkelijk met de legbuislengte vergeleken worden. Een dergelijke keuze heeft boven een vaste maatstaf bovendien het practische voordeel, dat men de visschen niet uit hun milieu behoeft te halen om ze te meten, doch rustig in hun bakje kan laten zwemmen. Daar de legbuis vlak voor de aarsvin omlaag hangt, kan men na eenige oefening haar betrekkelijke lengte met het ongewapende oog vrij snel en nauwkeurig schatten.

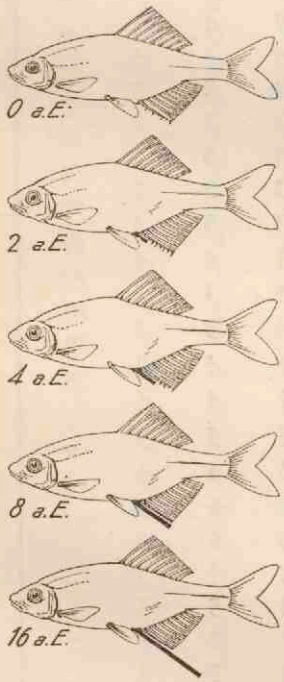


Fig. 4. De voorste aarsvinstraal is in 1/8 deelen verdeeld en dient als maatstaf voor de legbuislengte. 1/8 deel wordt 1 aarsvineenheid (= 1 A.E.) genoemd. Bij de bovenstaande visschen zijn de legbuizen resp. 0, 2, 4, 8 en 16 A.E. lang.

Gemakshalve wordt de eerste aarsvinstraal in gedachten gecalibreerd en wel in achtste deelen, daar deze verdeeling zich op het oog gemakkelijk laat onderscheiden. Fig. 4 illustreert deze schaalverdeeling.

Eén achtste deel zal hier voortaan één aarsvin-eenheid (= 1 A.E.) genoemd worden. 1. A.E. kan dus een wisselend aantal mm bedragen, doch stelt een vaste waarde voor ten aanzien van de werkzaamheid eener be-

paalde oplossing. *In het vervolg zal de legbuislengte steeds in A.E. uitgedrukt worden.*

Tabel 1 geeft een beeld van de nauwkeurigheid waarmee het schatten kan geschieden.

TABEL I

Nr. v. d. visch.	Aantal minuten na het begin van eerste meting. 0	10	25	40	55	70	80	90	100	
1	2	2	2	2	2	2	2	3	2	A.E.
2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	,,
4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
5	4	4	4	4	4	3	4	4	4	,,
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	,,
7	3	3	2	3	2	2	3	3	2	,,
8	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
9	4	5	5	5	5	5	5	5	5	,,
10	2	2	2	2	2	2	3	2	2	,,
11	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
12	4	4	4	4	4	4	4	4	4	,,
13	3	2	3	2	3	2	3	3	2	,,
14	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
15	4	4	4	4	3	4	4	4	4	,,
16	3	3	3	4	3	4	4	4	4	,,
17	5	5	5	5	5	5	5	5	5	,,
18	3	3	3	3	3	5	3	4	4	,,
19	6	5	6	6	6	6	6	6	6	,,
20	6	6	6	6	6	6	6	6	6	,,
21	4	4	3	3	4	4	3	4	3	,,
22	5	5	5	5	4	5	5	5	5	,,
23	6	6	7	7	7	7	7	7	7	,,
24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
25	4	4	3	3	4	4	4	4	4	,,
26	5	5	5	5	5	6	5	5	5	,,
27	4	5	4	4	5	4	5	5	5	,,

TABEL I (Vervolg)

Nr. v. d. visch.	Aantal minuten na het begin van eerste meting. 0	10	25	40	55	70	80	90	100	
28	5	5	5	5	5	5	5	5	5	,,
29	6	5	6	5	5	5	5	6	6	,,
30	0	1	1	1	1	1	1	1	1	,,
31	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
32	3	4	3	3	3	3	3	3	3	,,
33	2	2	2	2	2	2	2	2	2	,,
34	4	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
35	5	5	5	5	5	5	5	4	5	,,
36	2	2	2	3	2	3	2	3	3	,,
37	2	2	3	3	3	3	3	3	3	,,
38	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
39	2	2	2	2	2	2	2	2	2	,,
40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
41	3	4	4	4	4	4	4	3	4	,,
42	1	2	2	1	2	1	2	2	2	,,
43	2	2	2	2	2	2	2	2	2	,,
44	2	2	2	2	2	2	2	2	2	,,
45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	,,
46	1	1	1	2	2	1	2	1	2	,,
47	2	2	2	2	2	2	2	2	3	,,
48	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
49	4	3	4	3	4	3	3	3	3	,,
50	4	4	4	3	4	4	4	4	4	,,
51	2	2	2	2	2	2	2	2	2	,,
52	3	2	3	3	3	3	3	3	3	,,
53	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,,
54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	,,
55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	,,
56	2	2	2	2	2	2	2	2	2	,,
57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	,,
58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	,,
59	1	1	1	1	1	1	1	2	2	,,

Deze tabel heeft betrekking op een groep van 59 visschen waarvan de legbuislengten binnen bijna 2 uren 9 maal gemeten werden en waarbij de waarnemer de voorafgaande meetresultaten grootendeels vergeten had. Om ook grootere lengten te kunnen meten, n.l. die van 5—6 A.E., welke onder afwezigheid van hormoon snel terugloopen, was een langzaamwerkende stof toegediend, waardoor na verloop van twee uren een geringe lengtetoename is opgetreden.

Beschouwt men nu *de afwijkingen in de lengteschatting,* dan blijken deze voor iedere visch klein te zijn. 27 maal kwam het voor, dat bij een visch bij de 9 achtereenvolgende schattingen dezelfde legbuislengte vastgesteld werd. Bij de overige visschen was de afwijking slechts eenmaal grooter dan 1 A.E. Vooral bij legbuizen, waarvan de lengten juist tusschen 2 opeenvolgende geheele getallen inliggen (b.v. 2½ A.E.) zal men nu eens de lengte met het kleinere (2) dan weer met het grootere aantal (3 A.E.) aangeven, waardoor afwijkingen van 1 A.E. regelmatig kunnen voorkomen. *Hieruit blijkt, dat de toevallige fout per lengteschatting in de practijk niet grooter behoeft te zijn dan ½ A.E. en dat de gekozen eenheid dus niet te klein is.* Door nu het gemiddelde te nemen van twee of meer metingen per legbuis, kan deze afleesfout desgewenscht nog verder gereduceerd worden.

In de tweede plaats dient een onderzoek ingesteld te worden, naar *de grootte van de systematische fout* bij de lengteschatting. Hiervan kan men zich een denkbeeld vormen, door de frequentiekromme der in tabel 1 gemeten lengten te beschouwen, en b.v. na te gaan, of er voorkeur voor even of oneven getallen bestaat. Fig. 5 stelt de bedoelde frequentiekromme voor en geeft de indruk, dat

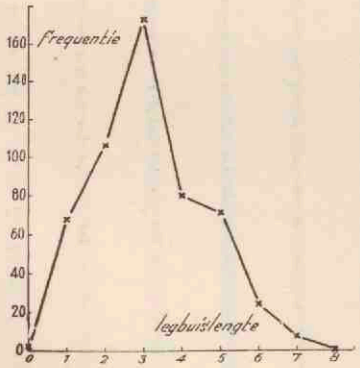


Fig. 5. Abscis: legbuislengte in A.E. Ordinaat: aantal malen, dat de legbuislengte voorkwam.

er bij deze proefreeks eenige voorkeur voor de oneven getallen (1, 3 en 5) geweest is. Dat deze voorkeur zich echter niet systematisch herhaalt, blijkt uit een andere proefreeks van 749 metingen, waarvan de frequentiekromme in figuur 6 is weergegeven.

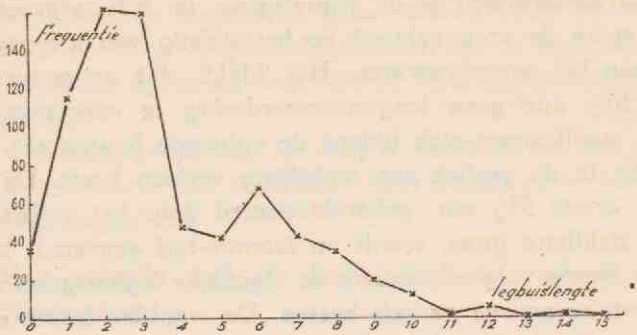


Fig. 6. Abscis : legbuislengte in A.E. Ordinaat : aantal malen dat de legbuislengte voorkwam.

Een en ander geeft niet de indruk, dat bij de lengteschattingen belangrijke systematische fouten gemaakt worden.

Wat de snelheid betreft, waarmede de legbuislengte geschat kan worden, zij vermeld, dat door een geroutineerd waarnemer binnen 20 minuten 100 metingen verricht kunnen worden.

De onderzoekingen, in dit hoofdstuk vermeld, zijn verricht met een bepaald soort urine, waarvan — zooals later uiteengezet zal worden (blz. 191 e.v.) — de werkzaamheid door één bepaald hormoon (-derivaat?) veroorzaakt wordt.

2) Hoe voltrekt zich de legbuisgroei in verband met de tijd?

Ten einde de proefduur te leeren kennen, die een optimaal resultaat verzekert, werd gedurende eenige tijd de gemiddelde legbuisgroei gemeten, welke bij een aantal visschen onder gelijke, constante, uitwendige omstandigheden optrad. Fig. 7 geeft hiervan een voorstelling.

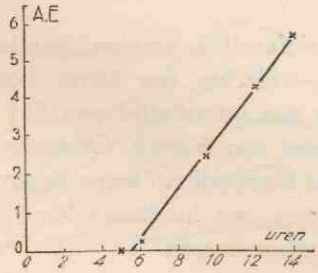


Fig. 7. Groeikromme na toediening van urine. Er is een latentietijd van 5½ uur en vervolgens een periode van lineaire groei.

Langs de ordinaat is de legbuisgroei in A.E. afgezet; op de abscis staan de uren volgend op het tijdstip van toevoeging van urine aan het aquariumwater. Het blijkt, dat er gedurende de eerste 5½ uur geen lengtevermeerdering te constateeren valt; daarna manifesteert zich tijdens de volgende 8 uren een legbuisgroei die in de grafiek een *rechtlijnig* verloop heeft. De periode van de eerste 5½ uur, gekarakteriseerd door het ontbreken van eenige zichtbare groei, wordt nu *latentie-tijd* genoemd; het tijdsverloop hierop volgend, waarin de eigenlijke legbuisgroei optreedt, zal voortaan *actieve periode* heeten. De woorden latent en actief zijn hier uitsluitend gebezigd ten aanzien van hetgeen de legbuis laat zien.

De punten van figuur 7 geven de gemiddelde groei van een groot aantal legbuizen, want, indien men de groei van een enkele als maatstaf nam, zou wegens de onnauwkeurigheid van de lengteschatting, en vooral ook door individueele onregelmatigheden, de kromme een minder regelmatig verloop toonen. *Voor het verkrijgen van het type der groeikromme is het derhalve noodzakelijk het gemiddelde van een groot aantal individueele curven te nemen.*

Uit de kromme blijkt, dat men reeds 12 uren na de toediening der urine een flinken legbuisgroei kan constateeren. De vraag is nu, of een langere inwerkingstijd nog grootere uitslagen zou geven. Figuur 8 leert, dat dit niet het geval is.

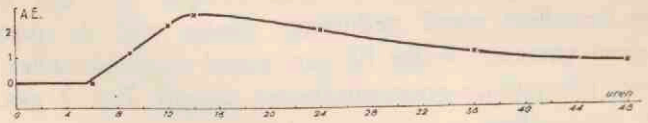


Fig. 8. Groeikromme na toediening van urine. Er is een latentietijd van 5½ uur. Op de periode van lineare groei volgt legbuisverkorting.

Bij deze proef werd — onder dezelfde omstandigheden als in de proef behoorend bij fig. 7 — slechts een kleine hoeveelheid urine toegediend. Men ziet weer een latentietijd van 5½ uur, gevolgd door een lineaire legbuisgroei van 6 uren. Ondanks de aanwezigheid van een nog werkzame hoeveelheid urine begint de legbuis zich 2 uren later te verkorten, om langzamerhand weer de oorspronkelijke uitgangslengte aan te nemen.

Nu blijkt, dat de latentietijd geen invloed ondervindt van de concentratie der toegevoegde substantie en dat de legbuisgroei ook bij een zwakkere oplossing ongeveer 12 uren na de toediening der urine ophoudt.

Een waarnemingstijd van 12 uren is vereischt om het optimum van de groeikromme vast te stellen, onverschillig welke hoeveelheid urine wordt toegediend.

3) Hoe voltrekt zich de legbuisgroei in verband met de temperatuur?

Daar een physiologisch proces, binnen bepaalde grenzen, sneller verloopt naar mate de heerschende temperatuur hooger is, kan men verwachten, dat ook de intensiteit van de legbuisgroei door de temperatuur beïnvloed wordt. Om deze invloed na te gaan, werd bij verschillende temperaturen de gemiddelde lengtetoename bepaald, die optreedt binnen 14 uren, na toediening van gelijke hoeveelheden der zelfde werkzame urine. (Fig. 9).

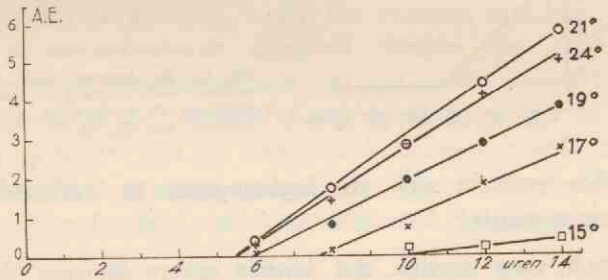


Fig. 9. Groeikrommen, verkregen na toediening van eenzelfde hoeveelheid urine, bij verschillende temperaturen.

Fig. 10 vertoont het verband tusschen legbuislengte en temperatuur, gemeten 6, 8, 10 en 14 uren na toediening der urine.

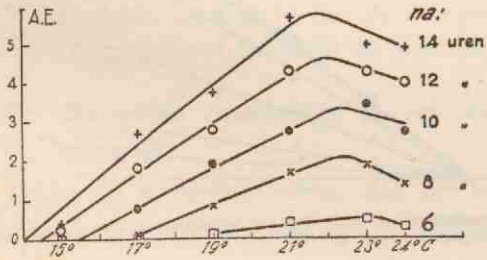


Fig. 10. Legbuisgroei, verkregen na toediening van eenzelfde hoeveelheid urine, bij verschillende temperaturen, na 6, 8, 10, 12 en 14 uren. Het optimum ligt bij ongeveer 22° C.

Men ziet, dat de legbuisgroei bij 15° C. uiterst gering is. Bij 21° C., misschien nog iets hooger (22° C.), ligt het optimum. De groei is bij 23° C. gedurende de eerste 10 uren het sterkst; naarmate deze temperatuur echter langer inwerkt wordt zij schadelijk. Bij een inwerkingstijd van 12 en 14 uren is de groei bij 21° C. het grootst.

Opmerkelijk is, dat in een bepaald traject een lineair verband bestaat tusschen mate van legbuisgroei en temperatuur.

Een temperatuur van 22° C. en een waarnemingstijd van 12 uren zijn — na toediening van urine — noodig om de optimale waarde van legbuisgroei te verkrijgen.

Verder blijkt uit fig. 9 dat de latentietijd langer wordt, naarmate de temperatuur daalt. Fig. 11 geeft het verband tusschen latentietijd en temperatuur weer. Het lineaire traject tusschen 15—19° C. is tekort om er conclusies ten aanzien van het temperatuurquotient uit te trekken.

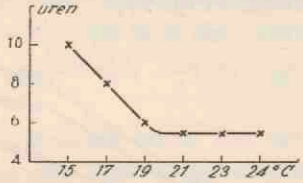


Fig. 11. De kromme geeft het verband weer tusschen de latentietijd en de temperatuur, en is ontleend aan fig. 9.

4) Hoe voltrekt zich de legbuisgroei in verband met de concentratie?

Verwacht mag worden, dat, binnen zekere grenzen, de legbuisgroei sterker is naarmate meer urine wordt toegediend. Om het ver-

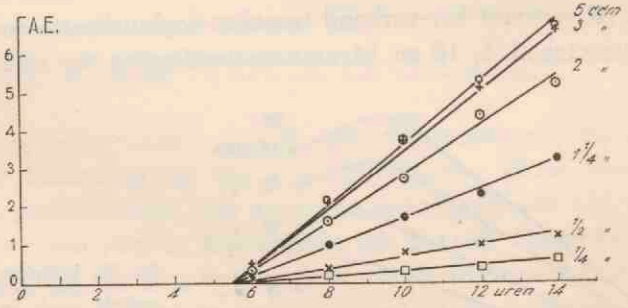


Fig. 12. Groeikrommen, verkregen na toediening van verschillende hoeveelheid urine bij een temperatuur van 22° C.

band tusschen concentratie der werkzame substantie en hierdoor veroorzaakte legbuisgroei na te gaan, werd gemeten, welke gemiddelde lengtetoename binnen 14 uren optrad na toediening van verschillende hoeveelheden werkzame substantie, onder handhaving van de optimale temperatuur (fig. 12).

Figuur 13 is gebaseerd op fig. 12 en toont het verband tusschen legbuislengte en urineconcentratie gemeten 6, 8, 10, 12 en 14 uren na toediening der urine.

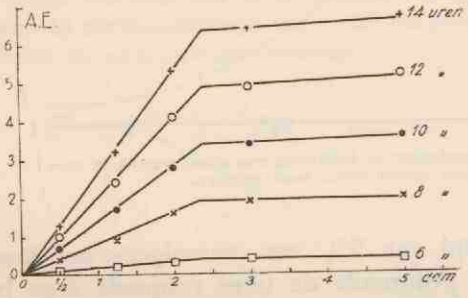


Fig. 13. Legbuisgroei, verkregen na toediening van verschillende hoeveelheden urine, na 6, 8, 10, 12 en 14 uren, bij 22° C.

Men ziet, dat de kromme, welke het verband tusschen legbuisgroei en urine-concentratie aangeeft, binnen het traject van 0—2½ ccm urine, toegevoegd aan 750 ccm water, lineair verloopt; daarna buigt zij af om evenwijdig aan de abscis verder te loopen. Dit eerste gedeelte van de concentratiekromme wordt de testmarge genoemd. Deze strekt zich bij deze werkzame substantie van urine uit over een gebied van 0 tot ongeveer 5 A.E., indien na 12 uren gemeten wordt.

De binnen de testmarge opgetreden legbuisgroei blijkt een maatstaf te zijn voor de hoeveelheid werkzame substantie; dank zij dit lineaire verband tusschen concentratie van de werkzame stof en mate van legbuisgroei is het bittervoorntje zoo goed te gebruiken als testobject.

Verder blijkt uit fig. 12 dat de concentratie der werkzame substantie geen invloed heeft op de latentietijd.

5) Na welke rustperiode is een quantitatieve reactie weer mogelijk?

Onder 2) werd opgemerkt, dat de legbuis wederom tot verkorting kan overgaan onder aanwezigheid der werkzame substantie

in kleine concentratie. Bij een groote concentratie blijft de legbuis echter langere tijd in haar volle lengte bestaan. Geeft men nu, na een intensieve legbuisgroei van 6—8 uren, schoon water, dan houdt de legbuisgroei op, terwijl 6 uren later de legbuisverkorting begint, zooals figuur 14 laat zien.

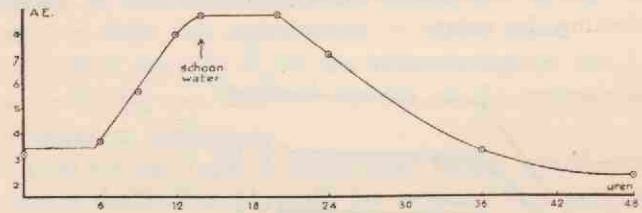


Fig. 14. Groeikromme verkregen na toediening van urine, waarbij 14 uren na het begin van de proef schoon water werd gegeven.

Men ziet de latentietijd van 5½ uur, vervolgens het lineaire traject van 6—6½ uur; gedurende de twee volgende uren buigt de kromme tot een horizontaal verloop af. 14 uren na de toediening der urine wordt schoon water gegeven. Nog 6 uren hierna blijft de legbuis haar lengte behouden om zich daarna langzamerhand te verkorten en eenige tijd nog op een lengte van ongeveer 2 A.E. te blijven staan.

Thans rijst de vraag, of het vischje in dit stadium weer in staat is een quantitatieve reactie te geven. De onder 6) te noemen proef geeft hierop een bevestigend antwoord.

Inmiddels is het niet alleen mogelijk, doch tevens noodzakelijk, de visschen met intervallen van 1—2 dagen te laten reageeren. Wacht men langer, dan verkort zich de legbuis na eenige tijd zoodanig, dat haar lengte = 0 A.E. wordt. De visch verkeert dan in een toestand van inertie, waarbij het vermogen quantitatief te reageeren nog slechts door toepassing van de op blz. 32 onder 3) genoemde kunstgreep hersteld kan worden, indien het althans niet geheel verloren is gegaan. Pas wanneer de legbuis door herhaalde toediening van werkzame substantie eenige groote reacties heeft gegeven en tot een beginlengte van ongeveer 2 A.E. is teruggeloopen, kan zij voor de quantitatieve bepalingen weer bruikbaar zijn.

Het bittervoorntje is in staat (gedurende een beperkte tijd), eens in de 1—2 dagen een quantitatieve reactie te geven.

Het is van belang te onderzoeken, of de grootte der legbuisreactie beïnvloed wordt door de uitgangslengte en zoo ja, welke uitgangslengten het meest geschikt zijn voor het geven van quantitatieve reacties. Hiertoe kan gebruik gemaakt worden van de nog ter sprake komende tabel III (blz. 29), waarin de 4 series metingen met 3 ccm urine A, zooals nog blijken zal, gelijkwaardig zijn. Berekent men welke gemiddelde verlengingen bij de verschillende uitgangslengten zijn opgetreden, dan komt men tot de conclusie (figuur 15) dat de gemiddelde lengtetoename bij een uitgangslengte van 1 A.E. het grootst is en vrijwel lineair afneemt naarmate de uitgangslengte toeneemt.

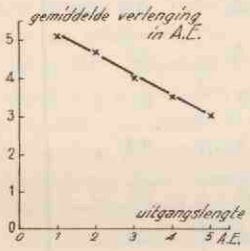


Fig. 15. De kromme geeft het verband weer tusschen uitgangslengte en gemiddelde verlenging bij de verschillende uitgangslengten.

(Bij twee andere, hier niet nader te vermelden, ongeveer even groote proefreeksen, bleek het lineaire verband minder uitgesproken te zijn.) In ieder geval is het niet onverschillig van welke beginlengte wordt uitgegaan bij het uitvoeren van quantitatieve bepalingen. Omdat het uitsluitend gebruik van visschen met een uitgangslengte van 1 A.E. bezwaren oplevert, kan men in de practijk het best zoo te werk gaan, dat steeds uitsluitend visschen met een beginlengte van 1, 2, en 3 A.E. in de proef worden opgenomen. *Het materiaal wordt dan zoo geselecteerd, dat steeds evenveel legbuizen met een beginlengte van 1 en 3 A.E. voorkomen, zoodat de reactie van deze gemiddeld overeen zal komen met die waarvan de uitgangslengte 2 A.E. bedroeg.*

6) Hoe dikwijls kan een visch voor het uitvoeren der reactie gebruikt worden?

Van practisch belang is de vraag hoe vaak eenzelfde visch gebruikt kan worden voor de ijking van urine. Men zou zich namelijk kunnen voorstellen, dat de visschen na enkele op elkaar volgende reacties òf hun reactievermogen verliezen òf in een toestand van overgevoeligheid geraken, waardoor de reacties naar verhouding te groot zouden worden.

De volgende proef geeft inzicht in deze questie.

Aan eenzelfde groep van 12 visschen werd om den anderen dag urine gegeven. Tabel II toon het verband tusschen de hoeveelheid toegediende urine en de legbuisreactie.

TABEL II

Toediening van	gemiddelde legbuisgroei
1e dag 3 ccm urine A	2,7 A.E.
3e „ 3 „ „ A	4,5 „
5e „ 3 „ „ A	4,2 „
7e „ 3 „ „ A	4,7 „
9e „ 3 „ „ B	0 „
11e „ 3 „ „ A	4,3 „
13e „ 2 „ „ A	2,7 „
15e „ 1 „ „ A	1,4 „

Bij de toevoeging van 3 ccm urine aan 750 ccm water werd de eerste maal een gemiddelde legbuisgroei van slechts 2,7 A.E. verkregen. Op de oorzaak hiervan (onvoldoende sensibilisatie, blz. 32) wordt nog teruggekomen; voorloopig wordt deze reactie buiten beschouwing gelaten. Bij de tweede, derde en vierde toediening van 3 ccm urine A traden echter zoo goed als gelijke reacties op,n.l. 4,5, 4,2 en 4,7 A.E. De vijfde maal werd 3 ccm eener onwerkzame urine (B) toegediend. Dit intermezzo beïnvloedde het quantitatieve reactievermogen echter niet, want een zesde toediening van de oorspronkelijke urine A gaf een reactie van 4,3 A.E., welke nagenoeg met de waarden, die bij de tweede, derde en vierde toediening werden gevonden, overeenkomt. Voor de zevende maal werd in plaats van 3, 2 ccm urine A gegeven. Overeenkomstig het onder 4) gevondene moest van deze dosis een reactie verwacht worden van 2/3 maal $(\frac{4,5 + 4,2 + 4,7 + 4,3}{4})$ A.E. = 2,7 A.E. Gevonden werd inderdaad 2,7 A.E. Tenslotte werd als achtste toediening 1 ccm urine A gegeven. Hiervan zou een reactie van 1,5 A.E. verwacht

moeten worden. Gevonden werd 1,4 A.E. deze waarden zijn voor quantitatieve reacties dus geheel bevredigend te noemen.

De visschen kunnen een groot aantal malen, dat proefondervindelijk vaak de 8 nog overtreft om de andere dag voor testdoeleinden gebruikt worden.

Het is van belang na te gaan of er een individueele gevoeligheid op lange termijn bestaat. Dit kan onderzocht worden aan de hand van tabel III, welke een nadere specificatie van tabel II is, en waarvan, zooals later nog blijken zal, de vier reeksen B, C, D en F gelijkwaardig zijn. In de eerstgenoemde tabel zijn de individueele reacties vermeld, welke vier maal achtereenvolgens bij een 12-tal visschen, onder steeds gelijke uitwendige omstandigheden bij gelijke hoeveelheden van dezelfde urine optraden. De reacties B, C en D werden met telkens één dag tusschenruimte uitgevoerd. Tusschen reeks D en F zijn twee extra dagen ingeschakeld wegens de toediening van onwerkzame urine (reeks E.)

Indien de in tabel III*) opgenomen visschen gedurende de hier beschouwde periode van 10 dagen een individueele gevoeligheid hadden, zou de spreiding van de verschillende reacties van eenzelfde visch op 3 ccm urine A in het algemeen kleiner geweest zijn dan de spreiding der reacties van verschillende visschen samen. Ter uitvoering van deze vergelijking is eerst *bij ieder vischje het gemiddelde van de vier verlengingen bepaald.* Vervolgens zijn de afzonderlijke afwijkingen δ van dit gemiddelde berekend. Uit deze δ's is de spreiding ε voor het betreffende vischje berekend volgens $\varepsilon = \sqrt{\frac{\sum \delta^2}{3}}$ **)

Een eenvoudige berekening leidt dan tot het volgende resultaat:

$$\varepsilon_1 = 0{,}96,\ 0{,}96,\ 0{,}50 \text{ enz., gemiddeld } 1{,}19.$$

Ter vergelijking zijn nu ook *groepen van telkens vier verlengingen bij verschillende visschen gevormd* (de eerste bestaat b.v. uit de verlengingen bij de visschen No. 1, 2, 3 en 4, na uitvoering der eerste reactie) en bij ieder van deze groepen zijn weer het gemiddelde en de spreiding (ε_2) berekend. Resultaat: $\varepsilon_2 = 0.96,\ 0.96,\ 0{,}82$ enz.: gemiddeld 1,22. Dus ε_1 (= 1,19) en ε_2 (= 1,22) zijn vrijwel gelijk. De conclusie mag derhalve luiden, *dat de visschen bij de vier achtereenvolgens verrichte reacties geen aantoonbare systematische gevoeligheidsverschillen bezaten.*

Ten aanzien van het verband tusschen concentratie der werkzame substantie en legbuisgroei kan op grond van de in tabel III vermelde gegevens nog nagegaan worden in hoeverre het zin heeft te spreken van een lineair verband tusschen beide grootheden, gegeven de bij deze proeven opgetreden spreiding van de waarnemingen. In tabel IV vindt men de, onder gelijke omstandigheden in

*) Deze tabel bevindt zich achterin het boek.

**) De formule $\varepsilon = \sqrt{\frac{\sum \delta^2}{N-1}}$ mag eigenlijk alleen gebruikt worden als N groot is. De fout is echter voor ε_1 en ε_2 dezelfde en heeft dus bij de vergelijking geen invloed.

12 uren verkregen, gemiddelde verlengingen, na toediening van 1, 2 en 3 ccm urine A, benevens de spreiding in het gemiddelde *). In figuur 16 zijn de ge-

TABEL IV

Hoeveelheid urine A in ccm.	1	2	3
Gemiddelde verlenging in A. E.	1.40	2.67	4.42
Spreiding in het gemiddelde (A.E.)	0.29	0.40	0.18

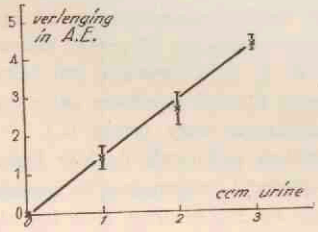


Fig. 16. De kromme geeft het verband weer tusschen legbuisgroei en urineconcentratie, onder inachtname van de spreiding.

middelden met hun onzekerheidsmarge weergegeven. *Het blijkt dat er een reëel lineair verband bestaat tusschen concentratie en legbuisgroei.*

7) Grondslag voor de testmethode.

Op grond van de onder 1 tot 6 besproken verschijnselen kan men zich de uitvoering der testmethode als volgt denken :

Men voegt een bepaalde hoeveelheid der te onderzoeken stof aan een bepaald volumen**) aquariumwater toe, waarin zich 2—3 visschen bevinden. Hierdoor kan een legbuisreactie optreden, waarvan de grootte in A.E. gemeten wordt. De reactie moet plaats vinden bij 22° C. De legbuizen dienen om de 1—2 uren, tot het ophouden van den groei, gemeten te worden. Men neme slechts zooveel der te onderzoeken substantie, dat de uitslag binnen de testmarge blijft. Voor iedere bepaling moet een voldoende aantal visschen worden genomen. Tevens zorge men er voor, dat de uitgangslengte der legbuizen ongeveer 2 A.E. bedraagt en dat de visschen 1—2 dagen vóór de te verrichten bepaling een positieve reactie hebben gegeven.

*) Deze berekening geschiedde met behulp van de formule $\frac{1}{\sqrt{N}}\sqrt{\frac{\sum \delta^2}{N-1}}$, waarbij $\delta =$ verschil tusschen een bepaalde gemeten verlenging en het gemiddelde der N gemeten verlengingen.

**) Om practische redenen werd in dit onderzoek steeds 750 ccm. gebruikt.

§ 3. DE VOORBEREIDING DER VISSCHEN VOOR DE TEST.

1) Uitsluiten van autonome groei.

Een factor, die tot verkeerde conclusies aanleiding kan geven is het verschijnsel van de autonome groei. Deze treedt bijna steeds aan de dag, wanneer uit het natuurlijke milieu komende visschen van koud water (2—8° C.) in water van 22° C. worden gebracht. Binnen 24—36 uren kan dan zonder meer een legbuisgroei van eenige A.E. optreden. In figuur 17 is de autonome groei grafisch

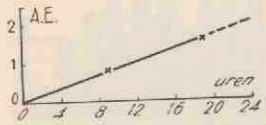


Fig. 17. Gemiddelde autonome legbuisgroei, opgetreden bij 54 visschen, welke van het natuurlijke milieu (4° C.) in water van 22° C. werden gebracht.

voorgesteld. Bij 54 visschen, welke uit een vijver met water van 4° C. kwamen en waarbij de temperatuur van het aquariumwater binnen 4 uren tot 22° C. werd opgevoerd, trad spontaan, dus zonder toediening van hormoon, na 9½ en 19½ uur een legbuisgroei van gemiddeld resp. 0.4 en 0.8 A.E. op. Het verloop der kromme doet vermoeden, dat binnen 2 dagen een spontane groei van gemiddeld 2 A.E. zou kunnen optreden.

Het verschijnsel der autonome groei doet zich echter nimmer voor bij visschen, die enkele dagen tevoren gereageerd hebben. *Autonome legbuisgroei kan men dus uitsluiten door visschen kort tevoren te laten reageeren.*

Voor de diepere oorzaken van de autonome groei wordt verwezen naar blz. 66.

De gevoeligheid van de visch moet eenige tijd constant blijven voordat het dier als meetinstrument bruikbaar is. Het onder 2, 3 en 4 vermelde maakt het mogelijk de visch in een dergelijke toestand te brengen.

2) „Afstomping" bij te groote beginlengte.

Wanneer men tusschen April en Juli visschen vangt, blijken hun legbuizen over het algemeen zeer lang te zijn en onbruikbaar voor het uitvoeren van betrouwbare reacties. De vraag is nu hoe deze legbuizen tot verkorting kunnen worden gebracht. Dit blijkt

mogelijk door de visschen eenige malen flink te laten reageeren. Wel leidt dit aanvankelijk tot een nog grootere legbuisverlenging, doch tenslotte begint een verkorting op te treden, die maakt dat de visch weer in staat is een reeks van quantitatieve reacties uit te voeren.

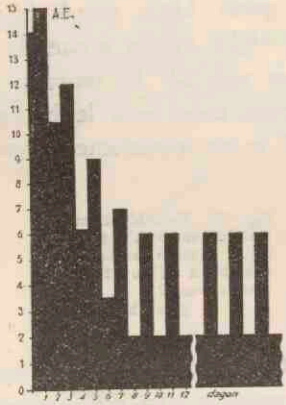


Fig. 18. Aanvankelijk is de beginlengte der, uit hun natuurlijke milieu komende visschen, groot (14 A.E.). Door de visschen herhaalde malen te laten reageeren wordt de beginlengte steeds kleiner, totdat bij een waarde van ongeveer 2 A.E. een niveau wordt bereikt, waarop quantitatieve reacties kunnen plaats vinden.

De grafische voorstelling van figuur 18 geeft van het bovenstaande een schematisch beeld. De veelvuldige hormoontoedieningen hebben blijkbaar een „afstompende" werking op de gevoeligheid van de visch. Voor de diepere oorzaak dezer „afstomping" wordt verwezen naar blz. 65.

In dit denkbeeldige geval zijn 4 reacties noodig om de visch tot een constante gevoeligheid te brengen en op dit niveau kunnen achtereenvolgens soms weer eenige quantitatieve reacties plaats vinden. In werkelijkheid kunnen er uitgangslengten voorkomen tusschen 1 en 3 A.E., terwijl de mate van legbuisgroei natuurlijk wisselt naar gelang van de werkzaamheid van de toegediende stof.

De tijdens de paaitijd aanwezige overmatige legbuislengte kan tot de normale uitgangslengte worden teruggebracht, wanneer men de visschen een aantal malen laat reageeren. Na de hierdoor bereikte „afstomping" kunnen de visschen soms weer quantitatief reageeren.)*

3) Sensibilisatie bij te lage beginlengte.

Wanneer men tusschen Augustus en November visschen ontvangt, zijn de legbuizen zelden langer dan 1 A.E. De dieren kunnen dan

*) In de maanden Mei—September zijn de visschen voor quantitatief onderzoek echter veel minder bruikbaar dan in de overige maanden.

niet terstond voor quantitatieve reacties gebruikt worden. Door ze echter herhaalde malen te laten reageeren, komt de legbuis meer en meer tot ontwikkeling en wordt het buiten de paaitijd afgenomen reactievermogen wederom opgewekt. De genoemde behandeling heeft blijkbaar een „sensibiliseerende" invloed. De visschen blijken, na gesensibiliseerd te zijn, weer in staat quantitatief te reageeren, overeenkomstig de onderstaande schematische figuur 19.

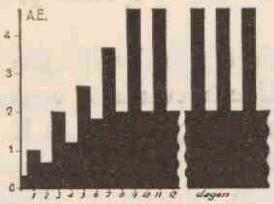


Fig. 19. Aanvankelijk is de beginlengte der, uit hun natuurlijke milieu komende visschen, klein (0 A.E.). Door de visschen herhaalde malen te laten reageeren wordt de beginlengte steeds grooter, totdat bij een waarde van ongeveer 2 A.E. een niveau wordt bereikt, waarop quantitatieve reacties kunnen plaats vinden.

In dit denkbeeldige geval zijn 4 reacties noodig om de sensibilisatie te voltooien. Hierdoor wordt een niveau bereikt, waarop een reeks van quantitatieve reacties kan plaats vinden. In werkelijkheid kunnen de uitgangslengten variëeren van 1 tot 3 A.E., terwijl de mate van legbuisgroei natuurlijk wisselt met de werkzaamheid van de toegediende stof.

De tusschen eind Augustus en October optredende inertie kan door herhaalde hormoontoediening weer opgeheven worden. Door deze zg. „sensibilisatie" reageeren de visschen weer quantitatief.

4) Afstomping bij normale beginlengte.

Wanneer men tusschen November en Maart visschen vangt, zijn de legbuizen van de meeste visschen 1—3 A.E. lang. Men zou geneigd zijn te denken, dat deze uitgangslengte, welke men immers na afstomping of sensibilisatie steeds tracht te verkrijgen, voor quantitatieve reacties uitstekend geschikt zou zijn. Dit is echter niet het geval. De eerste reactie valt reeds dadelijk te groot uit en de legbuizen behouden de verkregen lengte lange tijd. Het is, alsof deze eerste reactie de visschen in een 1—2 maanden te vroege paaitijd brengt. Om de visschen in het vroege voorjaar geschikt te maken voor het uitvoeren van quantitatieve reacties, dienen zij behandeld te worden als onder 2) vermeld.

Ondanks de tusschen November en Maart aanwezige goede uitgangslengte, geven de legbuizen van uit de natuur komende

visschen geen quantitatieve reacties. Pas na eenige hormoontoedieningen reageeren de visschen quantitatief.

5) Gevoeligheidsniveau.

In werkelijkheid kunnen dus de onder 2) en 3) besproken grafieken verkregen worden met behulp van gelijke hoeveelheden van dezelfde urine. Van beteekenis is :

a) dat de uitgangslengte der legbuizen zoowel na afstomping als na sensibilisatie, op een niveau van 1—3 A.E. gebracht kan worden,

b) dat een legbuis met een op deze wijze verkregen uitgangslengte van 1—3 A.E. op dezelfde hoeveelheid werkzame substantie met een groei van (in dit geval) 4 A.E. reageert, onafhankelijk van de omstandigheid of de visch zich in of buiten den paaitijd bevindt, resp. afgestompt of gesensibiliseerd werd.

Deze waarneming leidt tot constateering van het voor de practijk belangrijke feit, dat bij het bittervoorntje langs experimenteele weg een vrijwel constant gevoeligheidsniveau bereikt, en eenige tijd gehandhaafd kan worden. Door opeenvolgende zwakke reacties neemt weldra de gevoeligheid geleidelijk af. Deze kan door sensibilisatie echter weer tot het oorspronkelijke niveau teruggebracht worden, tenzij de visschen uitgeput zijn. Bij opeenvolgende sterke en middelmatig sterke reacties blijft de gevoeligheid echter lange tijd constant zoodat hernieuwde sensibilisatie dan niet noodig is. Het constant blijven der gevoeligheid draagt echter een temporair karakter, zoodat regelmatige contrôle van het gevoeligheidsniveau b.v. door ijking ten opzichte van standaardpreparaten, geboden is. Voor bijzonderheden betreffende de factoren, welke in oorzakelijk verband staan met de gevoeligheid wordt verwezen naar hoofdstuk VI.

Het is van belang het constante gevoeligheidsniveau aan de hand van tabel III nog eens nader te beschouwen. Zooals reeds werd medegedeeld, zijn in deze tabel de individueele reacties vermeld, welke vier maal achtereenvolgens door een reeks van 12 visschen, onder gelijke omstandigheden, uitgevoerd werden.

De gemiddelde verlengingen van resp. 4,50, 4,17, 4,67 en 4,33 A.E. wijzen op de aanwezigheid van een constant gevoeligheidsniveau.

Men kan nu nagaan, of de verschillen der vier gemiddelden niet grooter zijn dan men zou moeten verwachten, indien de 4 reeksen onderdeelen van

1 reeks van 48 gelijkwaardige uitkomsten waren. De spreiding bij de afzonderlijke verlengingen werd berekend met behulp der formule $\sqrt{\frac{\sum \delta^2}{N-1}}$ en is bij de 4 reeksen resp.: $\sqrt{\frac{9,00}{11}} = 0,9$, $\sqrt{\frac{17,6}{11}} = 1.3$, $\sqrt{\frac{38,6}{11}} = 1,9$ en $\sqrt{\frac{6,67}{11}} = 0,8$

De in de gemiddelden te verwachten middelbare fouten, berekend volgens de formule $\frac{1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{\sum \delta^2}{N-1}}$ zijn dus resp.: $\frac{0.9}{\sqrt{12}} = 0,18$, $\frac{1,3}{\sqrt{12}} = 0,25$, $\frac{1,9}{\sqrt{12}} = 0,36$ en $\frac{0,8}{\sqrt{12}} = 0,15$.

Het gemiddelde van alle 48 metingen bedraagt 4,42 A.E. De partieele gemiddelen, 4,50 ± 0,18, 4,17 ± 0,25 4,67 ± 0,36 en 4,33 ± 0,15 stemmen binnen de foutengrenzen hiermede overeen. Men mag de 4 reeksen dus inderdaad als onderdeelen van één reeks van 48 gelijkwaardige uitkomsten beschouwen, m.a.w. *onder de gegeven proefomstandigheden bestond er werkelijk een constant gevoeligheidsniveau.*

Alleen in Juli en begin Augustus is de legbuis bij een groot deel der in de natuur voorkomende bittervoorns tot 0 A.E. gereduceerd. Zelfs een intensieve urinebehandeling heeft dan ter nauwernood effect. Gedurende deze maanden vindt men echter nog wel eenige visschen, waarvan de legbuis niet zoo sterk teruggeloopen is en die voor de test nog bruikbaar kunnen zijn.

§ 4. VERSCHILLENDE IJKINGSMETHODEN.

1) IJking ten opzichte van een standaardpreparaat.

Bij quantitatieve biologische hormoonbepalingen is het gebruikelijk te ijken ten opzichte van een standaardpreparaat. Dit is noodig omdat de gevoeligheid der proefdieren min of meer afhankelijk is van de uiterlijke omstandigheden, b.v. het jaargetijde. Dit verschil in gevoeligheid kan geconstateerd worden, wanneer men in het voorjaar en in de herfst de verkregen reacties op eenzelfde standaardpreparaat met elkaar vergelijkt; deze blijken n.l. verschillend te zijn.

Om deze foutenbron uit te schakelen kan men in het algemeen als volgt te werk gaan. Gesteld dat in het voorjaar met een bepaalde hoeveelheid van een standaardpreparaat een reactie van 4 eenheden werd verkregen, terwijl dezelfde hoeveelheid in de herfst een reactie van slechts 3 eenheden geeft, dan blijkt, dat de gevoeligheid in de herfst ¾ is van die in het voorjaar. Vindt men

nu in de herfst bij quantitatief onderzoek van een onbekende hoeveelheid overeenkomstige substantie een reactie van 2 eenheden en wil men weten, hoe groot deze reactie in het voorjaar zou zijn uitgevallen, dan kan men op grond van de met het standaardpreparaat opgedane ervaring aannemen, dat de reactie dan zeer waarschijnlijk 4/3 × 2 eenheden = 2.7 E geweest zou zijn.

Door te ijken ten opzichte van een bepaalde hoeveelheid eener zoo mogelijk chemisch gedefiniëerde substantie, kunnen de uitgevoerde quantitatieve bepalingen ten allen tijde tot de absolute maatstaf herleid worden. Alleen op deze wijze kan men steeds reproduceerbare waarden verkrijgen.

Ter bepaling van het aantal legbuisgroei-eenheden van een preparaat van onbekende sterkte, kan men zich van verschillende methoden bedienen.

I. Parallele ijking.

Men laat b.v. 18 voorbehandelde visschen reageeren op een standaardpreparaat en meet de legbuisgroei. Door herhaalde reacties op telkens b.v. 100 visschen, is dit preparaat berekend op b.v. 3,5 A.E. Gesteld, dat van deze 18 visschen er 15 reageeren met een legbuisgroei van 3 à 4 A.E., waarvan het gemiddelde overeenkomt met de concentratie van het standaardpreparaat, en dat hiervan 2 visschen reageeren met slechts 2 A.E. en 1 met 5 A.E., dan worden deze laatste 3 visschen als niet voldoende ingesteld aan de verdere ijking onttrokken. De overblijvende 15 visschen laat men nu reageeren op het preparaat van onbekende sterkte. De mogelijkheid bestaat, dat eenige dezer visschen wederom geen quantitatieve reactie hebben gegeven. Om deze exemplaren op te sporen wordt uitgegaan van de speculatie, dat de kans dan groot is, dat deze visschen op een herhaalde toediening van het standaardpreparaat eveneens niet quantitatief zullen reageeren. Deze tweede reactie op het standaardpreparaat wordt uitgevoerd, en men zoekt nu die exemplaren uit, welke anders dan met een uitslag van 3—4 A.E. reageeren. Deze worden van de geselecteerde 15 visschen geëlimineerd. Indien op deze wijze weer 3 visschen uitvallen, resteeren nog 12 visschen, waarvan de legbuisgroei dus voor en na de ijking

van het onbekende preparaat twee maal ongeveer gelijk is geweest aan het aantal A.E. waarin de sterkte van het standaardpreparaat is uitgedrukt. Het is hoogstwaarschijnlijk, dat deze visschen ook quantitatief op het te onderzoeken preparaat hebben gereageerd, zoodat van deze 12 exemplaren de gemiddelde legbuisgroei als maatstaf voor de sterkte der onbekende concentratie genomen kan worden.

In plaats van een tweede ijking met het standaardpreparaat kan men ook direct nagaan hoe iedere visch gereageerd heeft op het onbekende preparaat, een frequentiekromme opstellen en die visschen uitsluiten, wier reactie opvallend sterk van het optimum afwijkt. De gemiddelde legbuisverlenging van de resteerende visschen is dan de maatstaf voor de werkzaamheid van het onderzochte preparaat.

II. Kruisgewijze ijking.

Men kan een reeks goed ingestelde visschen in twee gelijke groepen verdeelen, waarvan men de 1e groep laat reageeren op het preparaat van onbekende sterkte en de 2e op het standaardpreparaat. Aan de 2e reeks ontneemt men die visschen, welke een reactie vertoonen, die vrijwel overeenkomt met de sterkte van het standaardpreparaat en ijkt nu hierop het onbekende preparaat nog eens en het standaardpreparaat op reeks 1. Wederom worden, ditmaal uit reeks 1, die visschen, welke een zeer afwijkende reactie vertoonen, uit de voorgaande proef geëlimineerd. De som der bij alle bruikbare visschen gevonden eenheden van legbuisgroei, gedeeld door het aantal visschen is dan een maatstaf voor de gezochte sterkte van de stof.

2) IJking zonder standaardpreparaat.

Omdat het vermogen, quantitatief te reageeren, bij goed ingestelde visschen in hooge mate constant is, behoeft dit niet voor en/of na iedere reactie met behulp van een standaardpreparaat te worden gecontroleerd. Ook wordt de instelling der visschen practisch niet geschaad, wanneer ze afwisselend op een kleinere en grootere hoeveelheid werkzame substantie reageeren, mits steeds legbuizen met een beginlengte van 1—3 A.E. worden gebruikt. Hierdoor kan men op de volgende wijze ook zonder standaardpreparaat testen.

Men laat een aantal visschen op verschillende hoeveelheden van het te onderzoeken preparaat reageeren. Vervolgens herhaalt men de proef maar met andere, goed ingestelde visschen. Men vergelijkt nu de in beide reeksen verkregen uitkomsten. Wijken deze b.v. meer dan 0.3 A.E. van elkaar af, dan herhaalt men de proef nog een of meer malen, wederom met andere ingestelde visschen, totdat men waarden verkrijgt, die een bevredigende overeenkomst vertoonen. Met behulp van een frequentiekromme wordt dan het waarschijnlijke gemiddelde bepaald.

Zijn de visschen werkelijk goed ingesteld en worden zij goed onderhouden, dan zijn de eerste 3 reacties (als gemiddelde van 12 visschen) bijna steeds in voldoende overeenstemming met elkaar. Deze methode is gebleken practisch bruikbaar te zijn voor het testen van hormonen, welke nog niet in chemisch zuiveren vorm verkregen zijn.

§ 5. PROEFINSTALLATIE EN PRACTISCHE UITVOERING VAN DE TEST.

1) Proefopstelling.

Om iedere visch in zijn gedragingen te kunnen volgen waren de dieren ondergebracht in een 36-tal kleine aquaria met 750 ccm. water. De bakjes bevatten ieder 2—3 in grootte verschillende visschen en waren in eenige groote aquaria langs de lengte-zijden geplaatst. Deze groote aquaria dienden als thermostaat. Het voor- en zijaanzicht der installatie is in figuur 20 weergegeven.

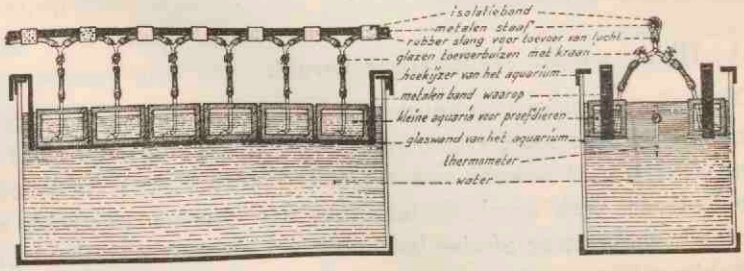


Fig. 20. Voor- en zijaanzicht der proefinstallatie.

In ieder bakje hing een uitstroomer, waardoor lucht borrelde.

Deze lucht werd geleverd door een krachtige pomp, welke voorzien was van een alarmtoestel, dat zich automatisch inschakelde wanneer de luchtdruk beneden een bepaald peil daalde.

De thermostaten werden op de gewenschte temperatuur gehouden door middel van een electrische verwarmingsinstallatie.

De geheele apparatuur was opgesteld in een matig verlicht vertrek, terwijl voor het meten der legbuizen een sterke lichtbron ingeschakeld kon worden.

2) Het onderhoud der visschen.

Bij het in gebruik nemen van nieuwe visschen werd ervoor gezorgd, dat het water pas na eenige uren de temperatuur van 20° C. bereikte. Snellere temperatuursstijgingen werden niet altijd goed verdragen.

De visschen werden gevoederd met gedroogde daphnia's Twee maal per dag werd het water der kleine aquaria, waarin de visschen zich bevonden, door schoon van 22° C. vervangen.

3) Het verloop van de test.

Met de proefneming werd meestal om 9 uur 's morgens begonnen, teneinde onnauwkeurigheden als gevolg van eventueele dag- en nachtschommelingen in de gevoeligheid uit te schakelen. Tevoren waren die visschen uitgezocht, welke voor het uitvoeren der reactie in aanmerking kwamen en de uitgangslengten werden gemeten. De getallen werden genoteerd. Er werd een bepaalde hoeveelheid der te onderzoeken stof toegevoegd en vervolgens werd om de 1—2 uren de legbuislengte gemeten. Zoodra de groei was opgehouden werd de proef afgebroken. De visschen werden in schoon water gedaan en terstond werden de legbuizen voor de laatste maal gemeten. Daarna werd de gemiddelde legbuisgroei per proefserie bepaald en de groeikromme geteekend.

Het verdient aanbeveling na toevoeging van de te ijken preparaten te controleeren of de visschen deze verdragen. Met zeer onrustig of soms ook apathisch gedrag reageeren ze op een voor hen toxisch preparaat en indien men dit waarneemt, doet men goed de proef af te breken en te trachten met geringe concentraties een positieve reactie te verkrijgen.

§ 6. BEPALING DER EENHEID VAN HORMOONWERKING.

In het voorgaande werd de legbuisgroei gemeten in aarsvineenheden (A.E.). Een reactie van 1 A.E. zegt echter niets omtrent de werkzaamheid der toegevoegde substantie, indien niet tevens vermeld wordt binnen hoeveel uren deze reactie van 1 A.E. bereikt werd en aan hoeveel aquariumwater de bepaalde hoeveelheid werkzame stof werd toegevoegd. Als eenheid van hormoonwerking kan men nu nemen die hoeveelheid, welke toegevoegd aan 750 ccm water van 22° C., binnen een bepaald aantal uren een gemiddelde legbuisverlenging van 1 A.E. veroorzaakt. Van deze eenheid van werking wordt in dit onderzoek gebruik gemaakt, tengevolge van de toevallige omstandigheid, dat met bakjes met 750 ccm water gewerkt wordt. Voor universeel gebruik zou de eenheid van werking beter gebaseerd kunnen worden op de gemiddelde legbuisgroei van 1 A.E., welke na n uren optreedt, wanneer de hiervoor noodige hoeveelheid werkzame substantie wordt toegevoegd aan 1 L. water. Deze eenheid wordt in het vervolg 1 bittervoorneenheid (1 B.E.) genoemd. De waarde van n hangt af van het onderzochte hormoon. *1 B.E. is die hoeveelheid werkzame substantie, welke toegevoegd aan 1 L. water van 22° C. in n uren een gemiddelde legbuisverlenging van 1 A.E. veroorzaakt.*

§ 7. OVER HET VERSCHIL TUSSCHEN DE TOT DUSVER GEBRUIKTE EN DE NIEUW ONTWORPEN TESTMETHODE. EEN KRITISCHE BESCHOUWING.

Blijkens opgaven in de literatuur wordt de legbuistest tot dusverre nog slechts op zeer primitieve wijze uitgevoerd. Men volstaat met de toevoeging van een bepaalde hoeveelheid hormoon aan een bekende hoeveelheid water, waarin zich enkele niet-voorbehandelde visschen met korte legbuizen bevinden. Na verloop van tijd wordt dan nagegaan, of een lengtetoename is opgetreden. De reproduceerbaarheid van het effect wordt niet nader onderzocht en alleen een sterke groei in verloop van meerdere dagen wordt als positieve reactie beschouwd.

Voor de analyse der groeireactie is deze methode echter even ontoereikend als voor de uitvoering eener quantitatieve bepaling. Ter verkrijging van een betrouwbare testmethode, is het nood-

zakelijk alle factoren te bestudeeren, welke de legbuisreactie kunnen beïnvloeden.

Wat betreft de omstandigheden, waaronder men tot nog toe de proefvisschen houdt, zij vermeld, dat temperaturen aanbevolen worden van 18° C. (kamertemperatuur) tot 10 à 12° C. (lage temperaturen). Het is echter gebleken, dat de temperatuur voor het tot stand komen der reactie van de grootste beteekenis is en het optimum bij de hooge temperatuur van 22° C. ligt. Bij deze temperatuur verloopt de legbuisreactie veel sneller, dan in de literatuur vermeld wordt.

Ten einde zuurstofgebrek te voorkomen moet het water krachtig met lucht doorstroomd worden.

Sommige onderzoekers achten het noodzakelijk, in plaats van leidingwater, oud aquariumwater te gebruiken, omdat de visschen dit beter zouden verdragen. Sedert gevonden werd (zie blz. 132), dat door bittervoorn-mannetjes een stof wordt afgescheiden, welke een sterke legbuisgroei veroorzaakt, is het gebruik van dergelijk water bedenkelijk indien er mannetjes in hebben gezwommen. **Daar gewoon leidingwater, tot 22° C. verwarmd, door de visschen uitstekend verdragen wordt, verdient dit de voorkeur.**

Er bestaat tot nog toe geen uniformiteit in de benoeming der eenheid van legbuislengte. Er wordt in absolute (mm), zoowel als in relatieve eenheden gemeten. Bij de eerste moet tevens de lengte van de visch vermeld worden, hetgeen vrij omslachtig is. De relatieve eenheden die men gebruikt zijn of moeilijk op het oog te schatten, (tiende deelen van de aarsvinstraal), of te groot (lengte aarsvinstraal, 2 × deze lengte enz.) De eenige bruikbare en practische eenheid lijkt de reeds gedefiniëerde aarsvin-eenheid, welke in verband met de gebruikte hoeveelheid aquariumwater, omgerekend kan worden tot de bittervoorneenheid als absolute maatstaf van hormoonwerking.

Met de voorbehandeling, waaraan de visschen onderworpen dienen te worden, alvorens tot het geven van quantitatieve reacties in staat te zijn, wordt een geheel nieuw principe ingevoerd, dat van essentiëele beteekenis is voor de bruikbaarheid van de legbuistest. Het principiëele verschil tusschen de tot nog toe gebruikte en de nieuw ontworpen methode wordt duidelijk, indien men het volgende bedenkt:

Tot nu toe werden voor de proefneming steeds visschen gebruikt, die òf nog nooit, òf drie weken tevoren voor het laatst, gereageerd hadden. Bij deze visschen is de bestaande legbuislengte een maatstaf voor de endocrine activiteit van het vischje. Gedeeltelijk is deze activiteit autonoom ingesteld, gedeeltelijk wordt zij door uitwendige factoren beheerscht (jaargetijde enz.). Laat men dergelijke visschen nu reageeren op gelijke hoeveelheden van eenzelfde werkzaam preparaat, dan vertoonen de legbuizen onderling groote verschillen in lengtetoename.

Ook kunnen sterke afwijkingen optreden, indien een bepaald preparaat op verschillende tijden van het jaar, bij uit de natuur komende visschen wordt getest. De dan gevonden legbuisgroei is eerder kenmerkend voor het wisselende gevoeligheidsniveau der visschen, dan voor de hoeveelheid werkzame stof.

Pas nadat het met behulp van een kunstgreep mogelijk bleek deze schommelingen in de gevoeligheid op te heffen, kon de basis geschapen worden, waarop de legbuistest als exacte meetmethode in dienst der endocrinologie kan worden gesteld.

Om de visschen bruikbaar te maken voor de uitvoering van quantitatieve reacties is het noodig:

a) de autonome sexueel-endocrine activiteit uit te schakelen,

b) de visschen op een bepaald gevoeligheidsniveau in te stellen en te behouden.

De kunstgreep, waarmede het sub a) en b) genoemde wordt bereikt, bestaat hierin, dat men de visschen zóó dikwijls krachtig laat reageeren, tot de uitgangslengte der legbuizen zich binnen 24—36 uren op 1—3 A.E. instelt. Zoodra dit het geval is, blijkt het constante gevoeligheidsniveau bereikt en is de gevoeligheid der visschen genormaliseerd. Ook de autonome legbuisgroei wordt door deze behandeling volkomen onderdrukt.

Het is van practisch niet te onderschatten belang, dat de legbuizen van de op deze wijze behandelde visschen zich zoo snel verkorten, dat men de dieren om de 24—36 uren opnieuw gebruiken kan.

De visschen kunnen vele malen achtereen gebruikt worden en door ijking ten opzichte van standaardpreparaten is een nauwkeurige contrôle op het gevoeligheidsniveau mogelijk.

HOOFDSTUK III.

DE SEXUEEL-ENDOCRINE ORGANISATIE VAN HET BITTERVOORNTJE IN VERGELIJKING MET DIE VAN HET ZOOGDIER.

§ 1. DE ENDOCRINE ORGANISATIE VAN HET VROULIJKE ZOOGDIER.

Alvorens over te gaan tot de analyse van het sexueel-endocrine stelsel van het bittervoorntje, lijkt het goed een kort overzicht te geven van de sexueel-endocrine organisatie van het zoogdier.

Hieromtrent bezit men in groote trekken de volgende voorstelling. De hypophyse-voorkwab wordt beschouwd als de „motor der sexueele functies" (B. Zondek). Dit orgaan beheerscht het gedrag der gonaden door middel van twee door haar afgescheiden gonadotrope hormonen: het follikelrijpingshormoon en het luteïniseeringshormoon. Het follikelrijpingshormoon doet de primordiale follikels tot groote follikels uitgroeien. Het luteïniseeringshormoon doet uit deze follikels corpora lutea ontstaan.

Onder invloed der genoemde gonadotrope stoffen scheidt het ovarium op zijn beurt de volgende twee hormonen af:

a. het follikelhormoon (folliculine), dat o. a. in het vocht der grootere follikels voorkomt. Het doet de uterus groeien, brengt het endometrium in de proliferatie-phase en wekt speciaal bij knaagdieren bronst op.

b. Het corpus luteum-hormoon (progesteron), dat in de corpora lutea gevormd wordt. Dit hormoon brengt het endometrium in de secretie-phase en bereidt de uterus zoodoende voor tot het opnemen van de bevruchte eicel.

Naast de directe invloed van de hypophyse-voorkwab op het ovarium, bestaat er een terugwerkende invloed van het ovarium

op de hypophyse-voorkwab. Door toediening van het follikelhormoon kan de hypophyse tot afscheiding van het luteïniseeringshormoon gebracht worden, waardoor corpora lutea ontstaan. Voor het progesteron heeft men een analoge retrograde werking echter niet met zekerheid kunnen vaststellen.

§ 2. DE ENDOCRINE ORGANISATIE VAN HET VROUWELIJKE BITTERVOORNTJE.

Inzicht in de endocrine organisatie van het dierlijk lichaam kan men krijgen door:

a. na te gaan, welke uitvalsverschijnselen zich voordoen na verwijdering of vernietiging van een bepaalde klier;

b. te onderzoeken of deze uitvalsverschijnselen door toevoer van extracten uit de betreffende klier weer opgeheven kunnen worden.

Bij het bittervoorntje verkeert het geslachtsapparaat — in tegenstelling tot de warmbloedige dieren — meer dan 9 maanden van het jaar in een toestand van rust. De geslachtsklieren vertoonen dan zoo goed als geen activiteit. De ovarium-extirpatie kan achterwege gelaten worden, wanneer men tracht, door toediening van een extract uit deze klier, kenmerken uit de periode van sexueele activiteit tevoorschijn te roepen.

In het volgende zal een kort overzicht gegeven worden van de overwegingen en bevindingen, welke tot de opstelling van het schema der sexueel-endocrine organisatie van het bittervoorntje geleid hebben. De hierbij te noemen histologische gegevens zijn te danken aan het werk van L. H. Bretschneider, dat tezamen met schrijver dezes elders gepubliceerd zal worden.

Zooals reeds werd medegedeeld is de legbuis een orgaan, dat door, bij zoogdieren voorkomende, geslachtshormonen, zooals folliculine, tot groei kan worden gebracht. Naar analogie van het feit, dat bij zoogdieren de uterus onder directe invloed van folliculine tot groei kan worden aangezet, hebben verschillende onderzoekers gemeend ook de legbuisreactie te moeten beschouwen als het gevolg van een directe invloed van folliculine. Op grond van de bevinding van Tomizyu Tozawa, dat na castratie tijdens de

paaitijd geen spontane legbuisgroei meer optreedt, zou de folliculine-productie dan in het bittervoorn-ovarium gelocaliseerd moeten zijn. Implantatie van een bittervoorn-ovarium bij een gecastreerde vrouwelijke muis heeft volgens Fleischmann c.s. (1932) een folliculine-reactie gegeven. (Dit proefresultaat behoeft echter nog een nadere bevestiging).

Tegen de opvatting, dat het folliculine gedurende de paaitijd de legbuis doet groeien, zijn echter verschillende argumenten aan te voeren.

1. De pogingen van Weismann c.s. (1936) om uit groote hoeveelheden ovaria van schelvisch, haring en zwaardvisch een extract te bereiden, dat in staat zou zijn, bij infantiele vrouwelijke muizen bronst op te wekken, bleven zonder resultaat. Hoogstwaarschijnlijk komen de bij zoogdieren oestrogeen werkende hormonen niet als zoodanig in visschen-ovaria voor. Wel is het aan schrijver dezes, in samenwerking met L. H. Bretschneider, gelukt uit de ovaria van een zeeduivel (Lophius piscatorius) een extract te bereiden, dat toegevoegd aan het aquariumwater, de legbuis van het bittervoorntje sterk doet groeien.
2. Indien de legbuisgroei onder directe invloed van het folliculine tot stand kwam, zou injectie of toediening van het chemisch-zuivere hormoon aan het aquariumwater reeds zeer spoedig een sterke verlenging moeten veroorzaken. In werkelijkheid blijkt folliculine een trage en laat beginnende reactie te geven, waardoor het zich duidelijk onderscheidt van alle andere in de legbuistest werkzame hormonen. Het extract uit het Lophius-ovarium geeft daarentegen een spoedig beginnende en vrij snelle legbuisgroei. *Hieruit blijkt, dat de werkzame substantie uit het Lophius-ovarium geen folliculine-achtig hormoon kan zijn.*

Het was nu van groot belang te weten, welke deelen van het bittervoorn-ovarium aansprakelijk gesteld moeten worden voor de bereiding van het „legbuis"-hormoon". L. H. Bretschneider werd bereid gevonden de ovaria van eenige bittervoorns te onderzoeken, waarbij de legbuis door toediening van urine tot groei was aangezet. Dit onderzoek heeft geleid tot een hoogst interessante en belangrijke ontdekking: *in het ovarium ontstaan*

massieve weefsels, die corpora lutea zullen worden genoemd, daar ze in zeer veel opzichten overeenkomst vertoonen met de bij het zoogdier onder deze naam voorkomende klieren. Later werden zij ook bij andere visschen, amphibiën en reptielen ontdekt. Terstond rees het vermoeden, dat de productie van het „legbuishormoon" in deze corpora lutea plaats zou hebben. Elders te publiceeren, uitgebreide onderzoekingen hebben de juistheid van dit vermoeden aangetoond. Met zekerheid kan thans worden aangenomen, *dat de groei van de legbuis onder de directe invloed van het corpus luteum-hormoon van het bittervoorntje plaats vindt.*

Zooals later aangetoond zal worden, is het hormoon uit visschen-corpora lutea niet identiek met het corpus luteum-hormoon van zoogdieren. Om verwarring te voorkomen, wordt het hormoon uit visschen-corpora lutea in het vervolg *oviductine* genoemd.

Uit de onderzoekingen van L. H. Bretschneider bleek verder dat na toediening van urine, zoowel in de latentietijd als tijdens de periode van lineaire legbuisgroei, zich ingrijpende veranderingen in het ovarium voltrekken. Reeds vóórdat de groei van de legbuis begint, wordt een aantal der grootste eieren zonder voorafgegane ovulatie in secretorisch actieve corpora lutea getransformeerd. Onder kunstmatige omstandigheden verloopt dit transformatieproces niet zooals de legbuisgroei lineair, doch rhythmisch.

Naar analogie van hetgeen bij de zoogdieren het geval is, deed zich vervolgens de vraag voor, of de vorming van corpora lutea ook bij het bittervoorntje door de hypophyse-voorkwab wordt beheerscht. Een preparaat van fijngemaakte karper-hypophysen, in de buikholte geïnjiceerd, veroorzaakte een stormachtige vermeerdering van het aantal corpora lutea en dientengevolge een intensieve legbuisgroei (zie fig. 21). Hierdoor wordt het vermoeden zeer ver-

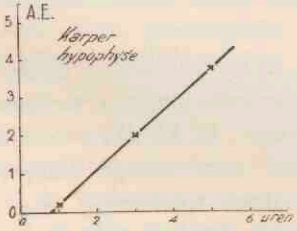


Fig. 21. Legbuisgroei na intraperitoneale injectie van fijngemaakte karper-hypophysen.

sterkt, dat ook een gonadotroop hormoon uit de hypophyse van

Rhodeus de luteïniseering van het ovarium bewerkstelligt. Het bewijs werd ten slotte geleverd toen het gelukte met behulp van een fijne boor de hypophyse te vernietigen, waarna toediening van anders werkzame hormonen geen reactie meer veroorzaakte.*)

De onderzoekingen van L. H. Bretschneider bewezen verder, dat onder invloed van de hypophyse-voorkwab het kiemepitheel tot productie van oöcyten overgaat, terwijl de reeds bestaande eieren tot groei worden aangezet, zonder echter geheel rijp te worden. Slechts twee maal gelukte het, door stimulatie van de hypophyse, buiten de paaitijd ovulatie op te wekken.

De invloed, welke de hypophyse-voorkwab op het bittervoornovarium uitoefent, kan men in 4 factoren verdeelen:

1. een germinotrope factor: bewerkstelligt de ontwikkeling van kiemepitheel tot oöcyten;
2. een ovotrope factor: van oöcyten tot groote, onrijpe eieren;
3. een eirijpings- en ovulatie-factor: van groote eieren tot rijpe eieren en ovulatie.
4. een luteïniseeringsfactor: van groote, rijpe eieren tot corpora lutea.

Zooals reeds vermeld is het gonadotrope hormoon uit de hypophyse van visschen niet identiek met een van de gonadotrope hormonen, welke bij zoogdieren gevonden worden. Dit blijkt uit de volgende proeven:

1. Geïnjiceerd werden 5 R.E. Pregnyl (= gonadotroop hormoon uit zwangeren-urine), een hoeveelheid die voldoende is om bij 5 ratten bronst op te wekken. Op de legbuisgroei had dit geen invloed.
2. Geïnjiceerd werden 3 R.E. Ambinon (= extract uit de hypophyse voorkwab van runderen). Ook dit had geen invloed op het geslachtsapparaat der visschen.
3. Omdat door de gelijktijdige toediening van Pregnyl en Ambinon de werking synergetisch versterkt wordt, werden geïnjiceerd: 5 R.E. Pregnyl en 3 R.E. Ambion. Ook tengevolge hiervan ontstond geen reactie.

*) Dr. K. v. Dongen was zoo vriendelijk de hypophyse-destructie te verrichten. Aangezien deze slechts eenmaal volkomen gelukte, zal de proef ter nadere bevestiging in de toekomst nog herhaald worden.

4. Geïnjiceerd werd 10 M.E. Antex Leo (gonadotroop hormoon uit serum van drachtige merries). Dit had een geringe legbuisgroei tengevolge.

Nadat het verband tusschen hypophyse-voorkwab en corpus luteum-vorming bekend was geworden, rees de vraag, of de waargenomen periodiciteit in het ontstaan der corpora lutea causaal verklaard zou kunnen worden uit eventueele voorafgaande periodieke veranderingen in de histologische structuur van de hypophyse-voorkwab. Het gelukte inderdaad rhythmische schommelingen in de hoeveelheid basophiel weefsel aan te toonen. Binnen een bepaalde periode fluctueert de hoeveelheid basophiel weefsel in gelijk rhythme als het aantal corpora lutea, met dien verstande, dat iedere phase in de hypophyse even eerder aanvangt dan die in het ovarium. Er moet dus ongetwijfeld een causaal verband bestaan tusschen de, op een bepaald moment aanwezige, hoeveelheid basophiel weefsel en het aantal corpora lutea.

Tenslotte kan de vraag gesteld worden, of de hypophyse op haar beurt door een hooger centrum geregeerd wordt. Er werd nog geen poging gewaagd, deze vraag langs experimenteele weg op te lossen. Met het oog op de innige histologische samenhang tusschen het diëncephalon, de pars neuralis hypophysis en de hypophyse-voorkwab en naar analogie van de toestand bij de zoogdieren, is de hypothese gerechtvaardigd, dat de hypophyse in meer of mindere mate bestuurd wordt door centra uit de thalamus opticus.

Op grond van het bovenstaande kan de sexueel-endocrine organisatie van het bittervoorntje dus als volgt gedefinieerd worden:

1. De hypophyse is ondergeschikt aan de sexueele centra van de thalamus opticus (hypothetisch).
2. De hypophyse-voorkwab ontvangt via de pars neuralis en de bloedbaan prikkels, tengevolge waarvan gonadotroop hormoon wordt afgescheiden.
3. Het ovarium wordt onder de invloed van het gonadotrope hormoon regelmatig met eieren aangevuld, de eieren groeien en er ontwikkelen zich corpora lutea. De rijpe, volgroeide corpora lutea scheiden het oviductine af.

4. De legbuis groeit uit onder de invloed van het oviductine.

Op grond van onderzoekingen van L. H. Bretschneider is gebleken, dat de legbuisgroei tot stand komt door:

1. vermeerdering van het aantal cellen door mitotische deeling der epitheelcellen en voornamelijk amitotische deeling der bindweefselcellen;
2. door volume-toename dezer cellen, tengevolge van lymphe-infiltratie en hydratatie van het collageen, waaruit zij bestaan;
3. passieve weefselrekking door verlaging van de weefseltonus en eventueele toename van de lymphe-druk (hypothetisch).

Vergelijkt men de sexueel-endocrine organisatie van het bittervoorntje met die van het zoogdier, dan blijkt er een principiëele overeenstemming te bestaan. Deze omstandigheid geeft aanleiding tot de volgende opmerking.

Tot nu toe is de sexueele endocrinologie uitsluitend bestudeerd aan de hand van warmbloedige dieren. De sexueel-endocrine organisatie der koudbloedigen is nog slechts zeer oppervlakkig onderzocht. Omdat de koudbloedigen (o.a. het bittervoorntje) veel eenvoudiger van bouw en toegankelijker voor onderzoek zijn dan de warmbloedigen, bestaat er alle aanleiding, voor de oplossing van een aantal sexueel-endocrinologische vraagstukken, bij voorkeur gebruik te maken van een koudbloedig dier als proefobject.

HOOFDSTUK IV.

LEGBUISGROEI, VEROORZAAKT DOOR GESLACHTSHORMONEN.

§ 1. INDEELING DER, BIJ WARMBLOEDIGEN VOORKOMENDE, GESLACHTSHORMONEN.

Men is ertoe gekomen de geslachtshormonen al naar hun werking in een aantal groepen te verdeelen. In de eerste plaats onderscheidt men de gonadotrope hypophyse voorkwab-hormonen. Hun chemische structuur is onbekend; waarschijnlijk zijn zij van eiwitachtige natuur. Door koken worden zij al spoedig vernietigd. Zij zijn niet oplosbaar in organische oplosmiddelen.

Hiernaast onderscheidt men de eigenlijke geslachtshormonen, welke grootendeels in de gonaden zelf gevormd worden, en alle tot de steroïden behooren. Zij zijn bestand tegen koken en in het algemeen goed oplosbaar in organische oplosmiddelen. Hun chemische structuur is bekend. Sommige dezer hormonen worden tegenwoordig niet meer uit dierlijke organen, doch synthetisch bereid. Ook is het gelukt hormoon-derivaten te bereiden, welke werkzamer zijn dan de natuurlijk voorkomende hormonen zelf. Ofschoon deze stoffen geen hormonen zijn in de oorspronkelijke beteekenis van het woord, is men toch gewoon hen met deze naam aan te duiden. In het volgende zullen zoowel de natuurlijk voorkomende als de kunstmatig bereide steroïden eenvoudigheidshalve hormonen worden genoemd; ook die, welke bij de warmbloedige dieren onwerkzaam zijn gebleken.

De tot de steroïden behoorende hormonen worden verdeeld in de volgende groepen:

a) de oestraan-groep,
b) de androstaan-groep,
c) de pregnaan-groep.

ad a) Tot de oestraan-groep rekent men de stoffen, welke verantwoordelijk zijn voor de groei der vrouwelijke geslachtsorganen. Het zijn groeistoffen met een specifieke werking op uterus, vagina en borstklier. Zij werken oestrogeen en brengen de proliferatiephase van het endometrium tot stand.

Deze vrouwelijke bronstverwekkende hormonen worden getest met behulp van de reactie volgens Allen-Doisy, die gebaseerd is op het feit, dat zij bij gecastreerde vrouwelijke muizen bronst opwekken, welke door het optreden van kernlooze, scholvormige epitheelcellen in het vagina-secreet gemakkelijk is te constateeren. Zij oefenen echter ook invloed uit op het mannelijk organisme, zoodat de benaming „vrouwelijk" slechts ten deele geldigheid heeft.

De oestrogene hormonen zijn in de natuur zeer verbreid en worden zoowel in het dieren- als in het plantenrijk gevonden. Bij de warmbloedigen vindt men ze voornamelijk in het ovarium (o.a. in het follikelvocht), de placenta en de urine. Groote hoeveelheden worden ook gevonden in de testikels van den hengst. De oestrogene hormonen komen dus zoowel in het vrouwelijke als in het mannelijke organisme voor.

De belangrijkste, later ter sprake komende vertegenwoordigers van de oestraan-groep zijn:

oestron,
oestradiol,
oestriol,

ad b) Tot de androstaan-groep rekent men de hormonen, welke verantwoordelijk zijn voor de groei der mannelijke gonaden en hunne accessorische organen. Het zijn groeistoffen met een specifieke werking op de mannelijke genitaaltraktus, en ze beïnvloeden de secundaire mannelijke geslachtskenmerken.

De mannelijke hormonen worden o.a. getest met behulp van de kamgroeireactie, waarbij de groei van de kapoenenkam als criterium geldt. Volgens Korenchevsky komen „echte" mannelijke hormonen niet voor, aangezien zij alle ook min of meer „vrouwelijke" eigenschappen bezitten.

Bij de warmbloedige dieren vindt men ze voornamelijk in de testis, de bijnier en urine. Ook in het vrouwelijke organisme komen kamgroeistoffen voor.

De belangrijkste, later ter sprake komende vertegenwoordigers van de androstaan-groep zijn:

de androsteen-verbindingen:	androsteendion, dehydro-androsteron, testosteron, androsteendiol,
de eigenlijke androstaan-verbindingen:	androstaandion, androsteron, dihydro-testosteron. androstaandiol.

ad c) Progesteron is het eenige van alle tot de pregnaan-groep behoorende hormonen, dat bij het zoogdier werkzaam is. Dit hormoon heeft tot taak, het, onder de invloed van het follikel-hormoon tot proliferatie gebrachte endometrium in de secretie-phase te brengen, zoodat gunstige voorwaarden worden geschapen voor de innesteling van de bevruchte eicel.

Het progesteron of corpus luteum-hormoon wordt getest met behulp van de methode volgens Allen-Corner, waarbij de genoemde transformatie van het uterus-slijmvlies als criterium geldt. De werking van progesteron is zoo specifiek, dat het als het eenige „echte" vrouwelijke hormoon geldt.

Het voorkomen van progesteron is beperkt tot het corpus luteum, de placenta en de bijnier. Verschillende derivaten worden bovendien in de urine gevonden. De belangrijkste, later ter sprake komende vertegenwoordigers van de pregnaan-groep zijn:

de pregneen-verbindingen:	progesteron, pregnenolon, pregneendiol,
de eigenlijke pregnaan-verbindigen:	pregnaandion, pregnanolon, pregnaandiol,
de allo-pregnaan-verbindingen:	allo-pregnaandion, allo-pregnanolon, allo-pregnaandiol.

Tenslotte moeten nog de cortex-steroïden genoemd worden. Of deze stoffen directe werkingen op de geslachtsorganen der warmbloedige dieren hebben is onbekend. Wegens hun nauwe chemische verwantschap met de geslachtshormonen en hun werkzaamheid in de legbuistest, dienen zij ook besproken te worden.

Bij de biologische test der voornaamste bijnierschors-hormonen dient de opheffing der uitvalsverschijnselen na wegname der bijnieren als criterium.

De cortex-steroïden worden uitsluitend in de bijnierschors gevonden. De belangrijkste, later ter sprake komende vertegenwoordigers dezer groep zijn:

corticosteron,
desoxycorticosteron.

§ 2. OVER DE SPECIFICITEIT DER LEGBUISREACTIE.

Toen voor het eerst werd waargenomen, dat legbuisgroei kunstmatig opgewekt kan worden door toediening van vrouwelijk bronstverwekkend hormoon (folliculine), werd gemeennd, dat deze reactie specifiek zou zijn voor oestrogeen hormoon. (Fleischmann c.s., 1932; Kanter c.s., 1934).

In 1936 vond Kleiner c.s., dat legbuisgroei optreedt na toediening van mannelijk hormoon. Hij meent, dat de legbuisreactie specifiek is voor dit hormoon.

In 1938 vond schrijver dezes, dat reeds met zeer kleine hoeveelheden progesteron een sterke legbuisgroei verkregen kan worden.

In hetzelfde jaar vond Fleischmann, dat de legbuisreactie ook door bijnierschorshormonen opgewekt kan worden.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de legbuisreactie als zoodanig niet specifiek is voor een bepaalde groep van geslachtshormonen.

De legbuisreactie zou hierdoor, wat haar practische bruikbaarheid betreft, alle belangstelling van de zijde der endocrinologie verliezen, ware het niet, dat op grond van uitgebreide proefnemingen vastgesteld kon worden, dat *de wijze waarop* de legbuisgroei zich voltrekt, specifiek is voor de aard van het toegediende hormoon.

Deze waarneming beteekent een keerpunt in de historie van de legbuistest.

In het volgende zal het type van groeikromme worden weergegeven, waardoor de oestrogene, mannelijke en progesteronachtige hormonen gekarakteriseerd worden.

§ 3. DIFFERENTIATIE DOOR MIDDEL VAN DE GROEIKROMME.

De in de volgende proeven gebruikte kristallijne hormonen, die in water moeilijk oplosbaar zijn, werden in propyleenglycol tot oplossing gebracht en in deze toestand aan het aquariumwater toegevoegd. Een gedeelte van het hormoon is dan in het water opgelost, de rest blijft fijn-dispers in het water zweven. De proeven werden verder geheel overeenkomstig de vanaf bl. 39 besproken wijze uitgevoerd.

1. De legbuisgroei na toediening van oestrogeen hormoon.

Na toediening van 1500 γ oestron aan 750 ccm water, trad een legbuisgroei op als in fig. 22 is weergeven.

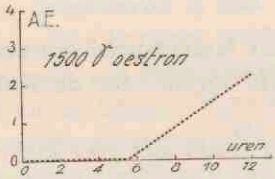


Fig. 22. Legbuisgroei na toediening van 1500 γ oestron. De latentietijd bedraagt 5½ uur. In werkelijkheid duurt de lineaire groei tot 60 uren na het begin van de proef.

De typische kenmerken der groeikromme, veroorzaakt door oestrogeen hormoon, zijn:

a. een latentie-tijd van 5½ uur,
b. een lineaire groei gedurende 60 uren, zooals nog nader (bl. 116 e.v.) blijken zal.

Zooals nog nader zal worden aangetoond (bl. 116 e.v.) gedragen alle tot dusver onderzochte, vrouwelijke bronstverwekkende hormonen zich ten opzichte dezer twee kenmerken principiëel gelijk als oestron.

2. De legbuisgroei na toediening van mannelijk hormoon.

Na toediening van 300 γ dehydro-androsteron aan 750 ccm water trad een legbuisgroei op als in fig. 23 is weergegeven.

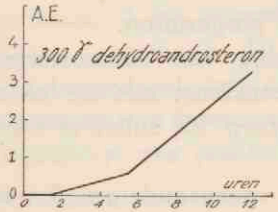


Fig. 23. Legbuisgroei na toediening van 300 γ trans- dehydroandrosteron. De latentietijd bedraagt 1 uur. 5½ uur na het begin van de proef is er een knik in de groeikromme, waardoor twee phasen onderscheiden kunnen worden.

De typische kenmerken der groeikromme, veroorzaakt door mannelijk hormoon, bestaan uit:

a) een lantentietijd van 1 uur,
b) een groei gedurende minstens 10 uren,
c) een knik in de groeikromme, 5½ uur na toediening van het hormoon. Hierdoor valt de kromme uiteen in de volgende twee phasen:

   1. een eerste groei-phase van 4½ uur, welke tusschen 1 en 5½ uur na toediening van het hormoon optreedt,

   2. een tweede groei-phase van 4½ uur, n.l. van 5½ tot 10 uur, na toediening van het hormoon.

Zooals nog nader zal worden aangetoond (bl. 99 e.v.) gedragen alle tot nu oe onderzochte natuurlijk voorkomende mannelijke hormonen zich ten opzichte dezer kenmerken principiëel gelijk aan androsteron.

3) De legbuisgroei na toediening van progesteron.

Na toediening van 1½ γ progesteron aan 750 ccm water trad een legbuisgroei op als in fig. 24 weergegeven.

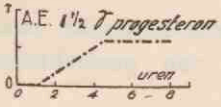


Fig. 24. Legbuisgroei na toediening van 1½ γ progesteron. De latentietijd bedraagt 1 uur en de lineare groei eindigt 4½ uur na het begin van de proef.

De typische kenmerken der groeikromme, veroorzaakt door progesteron, bestaan uit:

a. een latentietijd van 1 uur,
b. een lineaire groei gedurende 3½ uur.

Zooals nog nader zal worden aangetoond (bl. 75 e.v.) gedragen alle progesteron-achtige hormonen zich ten opzichte van deze kenmerken grootendeels gelijk aan progesteron.

(De groeikrommen na toediening van corticosteron en zijn derivaten toonen een groote overeenkomst met die na toediening van hormonen uit de progesteron-groep. Zij zullen in hoofdstuk IX nader besproken worden.)

Om het verschil in vorm der drie voorgaande groeikrommen aanschouwelijker te maken, zijn ze in één figuur afgebeeld (zie fig. 25).

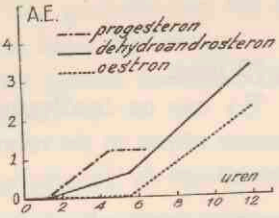


Fig. 25. Combinatie van fig. 22, 23 en 24. Door de oestron-kromme te laten superponeeren op de progesteron-kromme (welke bij een kleinere concentratie een nog geringere stijging zou vertoonen) ontstaat een lijn, welke door zijn knik op het 5½ uur-punt gelijkenis vertoont met de dehydroandrosteron-kromme.

Het is opvallend, dat men door combinatie van de groeikrommen van progesteron en oestron komen kan tot het soort groeikromme, dat voor de mannelijke hormonen typisch is. Als gevolg van deze beschouwingswijze zouden dan bij de kromme voor het mannelijke hormoon twee phasen te onderscheiden zijn, n.l. een pregnaan- en een oestraan-phase.

Deze omstandigheid is interessant in verband met het feit, dat de meeste mannelijke stoffen bij de warmbloedige dieren ook oestrogene en progesteron-achtige werkingen kunnen hebben (Korenchevsky, 1936) en derhalve eigenlijk bisexueel of beter gezegd ambisexueel (Parker) zijn.

Samenvattend kan dus nog eens herhaald worden, dat bij de zoogdieren de volgende groepen van geslachtshormonen onderscheiden worden:

a. de oestrogene (= vrouwelijke bronstverwekkende) hormonen,
b. de androgene (= mannelijke, kamgroei-) hormonen,

c. progesteron (echt vrouwelijk hormoon), alsmede de progesteron-derivaten.

De onderzochte vertegenwoordigers van alle drie groepen geven een legbuisreactie. Deze als zoodanig is dus niet specifiek voor een bepaald hormoon, of een bepaalde groep van hormonen.

Er is echter aangetoond, dat de wijze waarop de legbuisgroei zich voltrekt (uitgedrukt door de vorm der groeikromme) voor de besproken groepen van hormonen specifiek is. Deze omstandigheid geeft de legbuistest een practische beteekenis voor de endocrinologie.

HOOFDSTUK V.

KUNSTMATIGE LEGBUISGROEI ALS EINDEFFECT EENER ENDOCRINE KETEN-REACTIE.

In hoofdstuk III is uiteengezet, dat de legbuisgroei onder de directen invloed van het oviductine ontstaat. In hoofdstuk IV werd een overzicht gegeven van de bij warmbloedige dieren voorkomende geslachtshormonen, die alle legbuisgroei kunnen veroorzaken. Nu rijst de vraag: wat geschiedt er tusschen het moment van toediening dezer hormonen en het optreden van legbuisgroei?

Het visschenlichaam is over zijn geheele oppervlakte met schubben bedekt. Een snelle permeatie van hormoon door dit pantser is niet goed denkbaar. Voor opname van stoffen uit het water komt het uiterst dunwandige en bloedrijke kieuwepitheel eigenlijk uitsluitend in aanmerking.

Dat er een zeer snelle uitwisseling van stoffen kan plaats hebben wordt door het volgende gedemonstreerd: men voegt 1 mgr progesteron aan 750 ccm water toe. Binnen een kwartier liggen de visschen op hun kant, waaruit blijkt, dat het hormoon zeer snel opgenomen wordt. Doet men de visschen vervolgens in schoon water, dan herstellen zij zich na een kwartier weer volkomen. Als nawerking van de hormoonstoot treedt dan een sterke legbuisgroei op.

De mate van verbruik blijkt uit een proef, waarbij 5 maal om de 12 uren nieuwe, goed ingestelde, visschen in dezelfde hormoon-

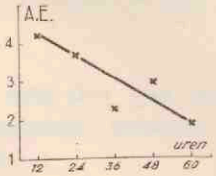


Fig. 26. De kromme representeert de legbuisgroei, welke door een bepaalde oplossing veroorzaakt wordt, indien men er vijf maal achtereen verschillende visschen in laat reageeren. De grootte der reactie neemt geleidelijk af.

oplossing werden gedaan. De legbuis-reactie werd toen steeds geringer, zooals uit fig. 26 blijkt. (Hierbij moet de mogelijkheid in acht

genomen worden, dat de verlaging der hormoonconcentratie ook een gevolg kan zijn van vernietiging door bacteriëele of andere invloeden.)

Bij zwakke hormoonconcentraties houdt de groei op, zoodra schoon water wordt gegeven. Onder deze omstandigheden is de aanwezigheid van hormoon dus noodzakelijk voor het onderhouden van de legbuisgroei (zie blz. 22, fig. 8).

Bij sterke hormoonconcentraties is een inwerkingsduur van ¼—½ uur reeds voldoende om een volledige reactie te ontketenen (zie fig. 27). Merkwaardig hierbij is ook het ontstaan eener, wel-

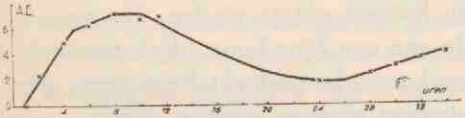


Fig. 27. De kromme representeert de legbuisreactie, opgetreden als gevolg van een zeer werkzame hoeveelheid hormoon (progesteron + desoxycorticosteron-acetaat). Na een inwerkingstijd van 20 minuten werd schoon water gegeven.

iswaar zwakkere, tweede reactie 25 uren na de eerste, ofschoon geen nieuwe hormoonstoot werd gegeven. Hieruit blijkt, dat een eenmaal gegeven, korte, doch intensieve hormoonstoot in de legbuisreactie rhythmisch nawerkt.

In hoofdstuk III is reeds gesproken over de sexueel-endocrine organisatie van Rhodeus. Hierbij bleek, dat de volgende schakeling bestaat: thalamus opticus (?) → hypophyse → ovarium (corpus luteum-vorming) → legbuis.

Bij legbuisgroei, die kunstmatig wordt opgewekt, n.l. door toediening van hormoon aan het aquariumwater, zou nu de prikkel, die de reactie inleidt, op verschillende punten van de keten kunnen aangrijpen. Het hormoon, door het kieuwepitheel in de bloedbaan binnengedrongen, zou als volgt kunnen inwerken:

direct op de legbuis,
direct op het ovarium,
direct op de hypophyse,
direct op de thalamus opticus.

Indien het hormoon direct op de legbuis inwerkte, zou dit orgaan in ieder geval ook onder uitschakeling van het ovarium moeten kunnen groeien. L. H. Bretschneider heeft een aantal bittervoorns gecastreerd door Röntgenbestraling en door extirpatie van het ovarium. Ondanks bijna toxische hormoondoses kon bij deze

visschen geen legbuisgroei meer worden opgewekt; bij de contrôlevisschen daarentegen wel. De proeven werden gedaan met vertegenwoordigers van alle besproken, bij zoogdieren voorkomende hormoongroepen en leverden steeds hetzelfde negatieve resultaat op.

Hieruit blijkt, dat geen der bij zoogdieren voorkomende oestrogene, mannelijke of progesteron-achtige hormonen in staat is zonder tusschenkomst van het ovarium, de legbuis te doen groeien.

Er is reeds op gewezen, dat het de corpora lutea zijn, welke door oviductine-afscheiding de legbuis doen groeien.

Indien de genoemde hormonen uitsluitend direct op het ovarium inwerkten, zouden luteïnisatie en legbuisgroei ook onder uitschakeling van de hypophyse moeten kunnen plaats vinden. Na vernietiging der hypophyse met behulp van een fijne boor, bleek toediening van eenige bij zoogdieren voorkomende geslachtshormonen, geen luteïnisatie en ook geen legbuisgroei meer te kunnen geven.

Hieruit blijkt, dat geen der onderzochte, oestrogene, mannelijke of progesteron-achtige hormonen in staat is, zonder tusschenkomst der hypophyse, corpus luteumvorming of legbuisgroei te veroorzaken.

De vraag, of een, door het kieuwepitheel in de bloedbaan opgenomen hormoon direct of via de thalamus opticus op de hypophyse inwerkt zou slechts na doorsnijding van de hypophyse-steel beantwoord kunnen worden. Deze ingreep stuit voorshands nog op technische moeilijkheden.

Naar analogie van hetgeen bij de zoogdieren het geval schijnt te zijn, wordt voorloopig aangenomen, dat de cholesterine-achtige hormonen op de thalamus opticus inwerken en zoodoende een indirecte inwerking op de hypophyse-voorkwab uitoefenen.

De kunstmatig opgewekte legbuisgroei blijkt dus eveneens het quantitatieve eindeffect te zijn van de volgende endocrine reactieketen: hormoon → (kieuwepitheel → bloedbaan) → thalamus opticus → *hypophyse-voorkwab* → (gonadotroop hormoon) → *ovarium (corpora lutea)* → *(oviductine)* → *legbuisgroei.*

Op blz. 24 is opgemerkt, dat er een traject bestaat, waarbij de legbuisgroei evenredig is aan de hoeveelheid toegediend hormoon. Om een later ter sprake komend voorbeeld te noemen: als 10 γ progesteron na 4½ uur een legbuisgroei van 4 A.E. geeft, dan ver-

oorzaakt 5 γ in dezelfde tijd een groei van 2 A.E. Bedenkt men nu, dat deze reactie quantitatief uitvalt ondanks de vele schijven (kieuwepitheel, hypophyse, ovarium, legbuis) waarover zij loopt, dan verwondert men zich over de fijne afstelling van het reactiemechanisme van Rhodeus amarus.

Het feit, dat de werking van alle tot nu toe onderzochte steroïden steeds in de vorm van legbuisgroei tot uiting komt, heeft nog een bijzondere beteekenis.

Bij de warmbloedige dieren oefenen de cholesterine-achtige hormonen in de eerste plaats directe werkingen uit op het geslachtsapparaat en de secundaire geslachtskenmerken. De reacties, welke door deze hormonen veroorzaakt worden, zijn echter van zoo heterogene aard, dat een maatstaf ter onderlinge vergelijking hunner werkzaamheid niet aangelegd kan worden. In de bittervoorntest kan de werkzaamheid van alle verschillende steroïden echter volgens één en dezelfde maatstaf, n.l. de legbuisgroei, gemeten worden. Door de legbuistest is de onderlinge vergelijking tusschen de werkzaamheid van manlijke, oestrogene en progesteron-achtige hormonen dus eigenlijk voor het eerst mogelijk geworden. Dat dit tot verrassende resultaten leidt, zal uit de volgende hoofdstukken blijken.

HOOFDSTUK VI

DE NOODZAKELIJKHEID DER VOORBEHANDELING VANUIT EEN HISTOLOGISCH STANDPUNT BEKEKEN.

In hoofdstuk II zijn verschillende begrippen, zooals afstomping, sensibilisatie en gevoeligheidsniveau gebruikt, zonder dat nader werd ingegaan op de verschijnselen, waarop deze begrippen feitelijk berusten. Het is hier de plaats ze nader te bespreken.

Uit onderzoekingen van L. H. Bretschneider*) is gebleken, dat in het ovarium van Rhodeus, de eieren-bevattende follikels (in het vervolg kortweg eieren genoemd), geen continu opklimmende reeks van klein (oöcyt) naar groot (rijpe follikel) vormen, doch in 3 duidelijk te onderscheiden groepen uiteenvallen. Het ovarium kan n.l. tegelijkertijd een groep van kleine, middelgroote en groote eieren bevatten. Iedere groep representeert een afgesloten ontwikkelingsphase in de ovogenese en laat zich histologisch als volgt definieeren :

Groep 1. Kleine eieren. De doorsnede varieert van 10—200 μ. Er is nog geen dooier aanwezig. De inhoud is acidophiel.

Groep 2. Middelgroote eieren. De doorsnede varieert van 200—500 μ. Er is reeds een primaire dooiervorming. De inhoud is basophiel. Een oölemma is nog niet aanwezig.

Groep 3. a) Groote eieren. De doorsnede varieert van 500—850 μ. Er is een secundaire dooiervorming. De inhoud is basophiel. Er is een oölemma.

*) Deze onderzoekingen zullen binnenkort gepubliceerd worden. Voor verdere bijzonderheden wordt naar de origineele publicatie verwezen.

b) Rijpende en rijpe eieren. De doorsnede varieert van 850—2000 μ. Er is een dik, laagsgewijze opgebouwd oölemma. De ei-inhoud is gerangschikt in een vegetatief en een animaal gedeelte.

Op verschillende tijden van het jaar is de verhouding tusschen het aantal eieren uit de genoemde drie groepen verschillend, zooals figuur 28 laat zien*). De drie krommen in deze figuur represen-

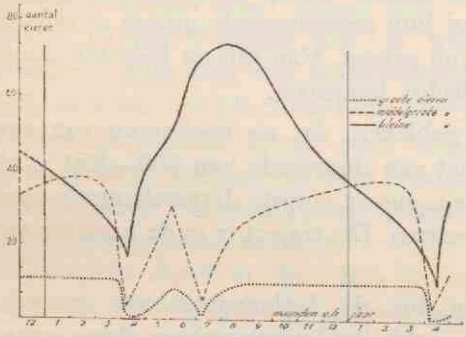


Fig. 28. Hier wordt het verband aangegeven tusschen de maanden van het jaar en het door L. H. Bretschneider gevonden aantal kleine en groote eieren per coupe. Gedurende een groot deel van het jaar blijft het aantal groote eieren per coupe constant.

teeren het aantal kleine, middelgroote en groote eieren, dat over een geheel jaar gevonden werd. Tijdens het leggen in April daalde het aantal eieren. In Mei en Juni ontstonden opnieuw rijpe eieren, welke begin Juli gelegd werden. Vanaf Augustus vond de definitieve restitutie van het ovarium plaats. Het aantal kleine eieren nam af, door overgang in middelgroote. *Van September tot Maart daarop volgend bleef het aantal groote eieren constant en bedroeg gemiddeld 9—11 per coupe.*

De afmetingen dezer groote eieren bleven in de loop van het jaar niet constant, zooals uit figuur 29 te zien is. In deze figuur is nog eens de kromme, welke betrekking heeft op het aantal

*) De in dit hoofdstuk opgegeven aantallen eieren stellen slechts relatieve waarden voor, welke als volgt werden bepaald: Er werden overlangsche seriecoupes van de ovaria gemaakt. Van iedere 20ste coupe werd het aantal elementen (= kleine, middelgroote en groote eieren, benevens corpora lutea) geteld. Voor ieder element werd het gemiddelde (relatieve) aantal bepaald, door de som der in iedere 20e coupe voor één element gevonden waarden te deelen door het aantal onderzochte coupes.

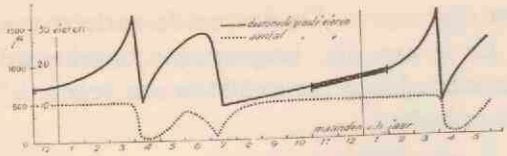


Fig. 29. Deze figuur toont het verband aan tusschen de maanden van het jaar en het gemiddelde aantal groote eieren per coupe met hun doorsnee. Het blijkt, dat de doorsnee der groote eieren in de herst- en wintermaanden slechts langzaam toeneemt.

groote eieren, weergegeven. De andere kromme duidt de grootte dezer eieren aan. Men ziet, dat van Februari tot Maart een aanzienlijke groei optrad. In deze tijd voltrok zich de overgang van groote naar rijpende en rijpe eieren. Toen deze laatste gelegd waren, groeiden de in Mei en Juni gerestitueerde groote eieren tot rijpe eieren uit en werden in Juli gelegd. Van Juli tot Februari d.o.v. groeiden de groote eieren slechts langzaam.

Proefondervindelijk is nu gebleken, dat na toediening van een hormoon, de groote eieren met een doorsnede van 600—850 μ bij voorkeur geluteïniseerd worden, dus de laagste drempelwaarde voor het luteïniseeringshormoon bezitten. Dit traject is in de kromme vet gedrukt.

De oviductine-productie en dus de legbuisgroei zijn grooter, naarmate er meer van deze gemakkelijk luteïniseerbare eieren voorhanden zijn. De grootte eener geprovoceerde legbuisreactie hangt dus af van de op een gegeven moment bestaande drempelwaarde voor het luteïniseeringshormoon en het aantal bij deze drempelwaarde luteïniseerbare eieren. Omdat dit aantal voor alle tijden van het jaar niet gelijk is, leveren de eerste, op verschillende tijdstippen geprovoceerde, legbuisreacties steeds verschillende resultaten op. Constante waarden kunnen pas verkregen worden na normalisatie van de ovariuminhoud. *Proefondervindelijk blijkt zich deze normalisatie vanzelf te voltrekken, wanneer men de visschen eenige malen achtereenvolgens krachtig laat reageeren.*

Het gerestitueerde ovarium van genormaliseerde visschen bevat steeds 9—11 eieren van 600—800 μ per coupe, welke bij een volgende reactie in de eerste plaats voor luteïnisatie in aanmerking komen. *Het constante gevoeligheidsniveau* (zie blz. 34) is nu niets anders dan de weerspiegeling van de constante drempelwaarde van de 9—11 eieren van 600—800 μ ten opzichte van het luteïniseeringshormoon.

Blijkens figuur 29 zijn dergelijke eieren bij, in de natuur voor-

komende visschen, van November tot Januari in het genoemde aantal aanwezig, zoodat dergelijke visschen in staat zouden moeten zijn dadelijk quantitatief te reageeren. Behoudens de eerste reactie, die noodig schijnt te zijn, om het mechanisme van de legbuisgroei op gang te brengen, geven de volgende reacties inderdaad steeds blijk van de aanwezigheid van een constant gevoeligheidsniveau.

Zooals uit figuur 29 te zien is, worden groote eieren (groep 3 a) in Februari en Maart grooter dan 800 μ en gaan over in rijpende en rijpe eieren (3 b). Bij luteïnisatie dezer eieren ontstaat aanzienlijk meer secretorisch actief corpus luteum-weefsel, dan bij de normale groote eieren. Vandaar dat, in weerwil van de iets hoogere drempelwaarde voor het luteïniseeringshormoon, de eerste reactie toch te groot uitvalt. Om deze overgevoeligheid weg te nemen, moeten de rijpende eieren door herhaalde reacties geluteïniseerd en opgeruimd worden. Na deze *afstomping* (zie blz. 33) wordt dan weer de groep van groote eieren gerestitueerd, welke het gewenschte gevoeligheidsniveau bezitten.

Tusschen April en Juli zijn de legbuizen over het algemeen lang, als gevolg eener intensieve autonome luteïnisatie van de groote, rijpende en zelfs rijpe eieren. Met behulp van herhaalde reacties kunnen deze eieren door luteïnisatie opgeruimd worden. Na deze afstomping *kunnen* de 9—11 normale groote eieren van 600—800 μ per coupe soms weer gerestitueerd worden, hetgeen echter slechts langzaam geschiedt. De ovaria, die in April vrijwel geledigd zijn, worden autonoom aangevuld en worden soms eind Juni of begin Juli opnieuw geledigd.

In de tweede helft van Juli en in Augustus is het aantal groote eieren zoo gering, dat practisch geen legbuisreacties verkregen kunnen worden.

Vanaf September tot November moeten de groote eieren door herhaalde reacties van 400 op minstens 600 μ gebracht worden. Door deze *sensibilisatie* (bl. 32) wordt dan weer het constante gevoeligheidsniveau bereikt.

Afstomping en sensibilisatie hebben dus ten doel een bepaald aantal eieren van bepaalde grootte met een bepaalde drempelwaarde voor het luteïniseeringshormoon te doen ontstaan. Dank zij de omstandigheid, dat de vorming van dergelijke eieren optreedt als restitutie-verschijnsel na een reeks van hormoonstooten, kan bij

Rhodeus, op vrijwel alle tijden van het jaar, een constant gevoeligheidsniveau bereikt worden.

Autonome groei zou het gevolg kunnen zijn van groei der groote eieren, tengevolge der temperatuursverhooging en de hierdoor dalende drempelwaarde voor het luteïniseeringshormoon, dat in de periode van physiologische rust steeds in kleine hoeveelheden wordt afgescheiden, ter instandhouding der gonaden.

HOOFDSTUK VII.

OVER DE CHEMISCHE CONSTITUTIE DER GESLACHTSHORMONEN.

De tot dusver bekende geslachtshormonen behooren tot de steroïden. Alvorens over te gaan tot de behandeling van het verband tusschen werkzaamheid en chemische constitutie der onderzochte hormonen is het goed eenige algemeene afspraken te noemen, waaraan men zich in de organische chemie met betrekking tot de nomenclatuur houdt en een overzicht te geven van de ruimtelijke bouw der steroïden.

Ten aanzien van de nomenclatuur heeft men o.a. de volgende afspraken gemaakt:

a) Verzadigde koolwaterstoffen dragen de uitgang -aan: methaan, aethaan, propaan, enz.

b) Het ontbreken van een waterstof-atoom aan ieder van twee aan elkaar grenzende koolstof-atomen, (waardoor een zgn. dubbele binding ontstaat), verandert de naam van de verzadigde koolwaterstof in een naam, die tot uitgang heeft -een, bijv. aethyleen, propyleen. Zoo leidt, tot op zekere hoogte hiermede vergelijkbaar, de invoering van één dubbele binding in cholestaan tot een stof cholesteen genaamd en op dezelfde wijze komt men van pregnaan tot pregneen.

De plaats van de dubbele binding wordt aangeduid door het △-teeken te plaatsen vóór de nummers der beide C-atomen, die deelnemen aan de dubbele binding. Zoo kent men △ 5,6- cholesteen, waarmede men bedoelt de koolwaterstof cholestaan met een dubbele binding tusschen de koolstofatomen 5 en 6.

Twee dubbele bindingen leiden tot een diëen, drie tot een triëen, enz.

c) Vervangt men een H-atoom door een OH-groep, dan wordt dat aangeduid door de uitgang -ol aan de naam van de stof toe te voegen. Zoo ontstaat uit aethaan aethanol, de bekende aethylalcohol. Vervanging van twee H-atomen aan verschillende C-atomen door OH-groepen leidt tot een -diol, enz. De plaats van de OH-groep wordt vaak aangegeven door het rangnummer van het C-atoom, dat de OH-groep draagt, achter de uitgang -ol te vermelden.

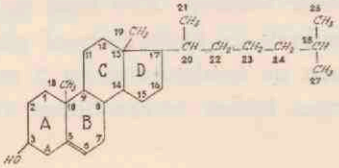
d) Vervangt men twee H-atomen, die aan hetzelfde C-atoom gebonden zijn door één (immers 2-waardig) O-atoom, en bevindt zich dat C-atoom tusschen twee andere C-atomen, dan noemt men het product een keton en duidt dat aan door de uitgang -on achter de naam van de moedersubstantie te plaatsen. Zoo ontstaat uit propaan propanon, het bekende aceton.

De groep $> C = O$ draagt de naam carbonyl-groep. Bevat een stof twee carbonylgroepen, dan noemt men deze een -dion; 3 carbonylgroepen leiden tot een -trion, enz. Ook hier heeft het nummer achter de uitgang -on betrekking op de plaats van het C-atoom van de carbonyl-groep. Draagt het molecuul zoowel een -OH als een =O, dan leidt dit tot een -olon.

De scheikunde der geslachtshormonen hangt ten nauwste samen met die der steroïden, waarmee men pleegt aan te duiden de klasse van verbindingen die verwant zijn met het cholesterine, een stof, die in het planten- en dierenrijk algemeen verbreid is en o.a. in de hersen- en de zenuwsubstantie wordt aangetroffen.

Daar het dierlijke organisme de beschikking heeft over cholesterine is het waarschijnlijk, dat deze stof de bron is waaruit de galzuren, het koprosterine en de geslachtshormonen afkomstig zijn, alle stoffen, die men eveneens in het dierlijke organisme aantreft.

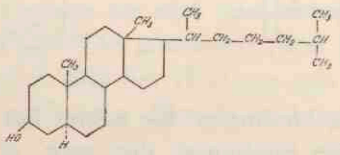
De formule van cholesterine is onder I weergegeven.



Form. I

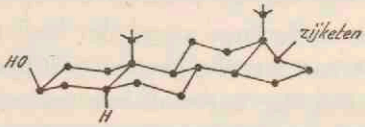
De naam cholesterine verandert door toepassing van bovenstaande afspraken betreffende de nomenclatuur in △ 5,6-cholestenol-3.

Daar het cholesterine in de chemie der steroïden een centrale plaats inneemt doordat het hoofdzakelijk cholesterine was waarvan men het eerst de structuur bepaalde (-de overige steroïden kunnen in cholesterine worden overgevoerd of omgekeerd, of zij hebben afbraakproducten met cholesterine gemeen-) kan een beschouwing van de ruimtelijke bouw der steroïden het best uitgaan van het cholestanol-3, een der stoffen die men uit cholesterine verkrijgt door de dubbele binding op te heffen door zoowel aan het 5e als aan het 6e C-atoom een H-atoom toe te voegen. De formule van cholestanol-3 is onder II aangegeven.



Form. II

In het atoom-model van cholestanol-3 (zie III) zijn met korte streepjes alleen die H-atomen geteekend, die een bijzondere beteekenis hebben. De stippen stellen koolstof-atomen voor.



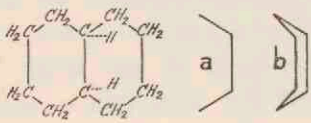
Form. III

Cholestanol-3 heeft 9 asymmetrische C-atomen, n.l. op de plaatsen 3, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 17 en 20. Er zijn dus $2^9 = 512$ stereo-isomeren mogelijk, bestaande uit 256 paren antipoden. In de natuur zijn bij de steroïden echter slechts enkele mogelijkheden gerealiseerd. De absolute sterische configuratie heeft men nog niet kunnen vaststellen, daarom heeft men, juist zooals bij de suikers, waar de d-glucose het uitgangspunt vormt, aangenomen dat de CH_3-groep aan C^{10} naar voren komt uit het vlak van teekening, als het molecuul op het papier staat, zooals men overeengekomen is het te schrijven (zie II). Valt het H-atoom aan C^5 nu ook aan de voorzijde van het papier, dan zegt men dat het in cis-positie ten opzichte van CH_3 aan C^{10}

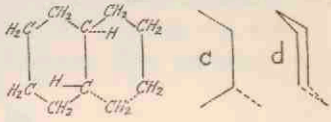
staat; valt het aan de achterzijde van het papier dan noemt men dat trans t.o.v. CH_3 aan C^{10}.

Beschouwt men nu de toestand aan de paren C-atomen, die de ringen telkens gemeen hebben, dus de paren C^{10} en C^5, C^8 en C^9, C^{13} en C^{14}, dan blijkt, dat aan elk van deze 3 paren C-atomen twee cis- en twee trans-standen mogelijk zijn. Deze structuren kunnen het best nader beschouwd worden bij het decahydronaphtaline (= decaline), dat weliswaar geen steroïd is, doch waarbij hetzelfde in eenvoudiger vorm gevonden wordt.

Het decaline komt in twee vormen voor, de eene met de cis- en de andere met de trans-configuratie (zie resp. IV en V).



Form. IV



Form. V

Gestippeld zijn de bindingen, die achter het vlak van teekening vallen, getrokken zijn bindingen, die voor of in het vlak van teekening vallen. Fig. IVa vertoont de onderlinge stand der C-atomen van het cis-decaline recht van terzijde gezien. Fig. IVb geeft een indruk van hetgeen te zien is wanneer men de rechter helft van het cis-decaline van terzijde onder een hoek beschouwt; men noemt deze vorm van de koolstof 6-ring het badkuip-model. Fig. Vc vertoont de onderlinge stand der koolstof-atomen van het trans-decaline recht van terzijde gezien; gestippeld is dat deel van de rechter ring, dat achter het vlak van teekening valt.. Fig. Vd geeft een indruk van wat men ziet als men de rechter helft van het trans-decaline van terzijde onder een hoek beziet: deze vorm van de koolstof 6-ring noemt men het zetel-model. De H-atomen van de middelste C-atomen vallen bij het cis-decaline achter het vlak van teekening, bij het trans-decaline valt het bovenste waterstofatoom achter het vlak van teekening en het onderste H-atoom vóór het vlak aan teekening. Het cis-decaline heeft een symmetrie-vlak, het is dus intramoleculair gecompenseerd; dit is niet het geval met trans-decaline. Bij de steroïden gaat deze beschouwing niet meer op. Daar is nooit een symmetrie-vlak, zoodat er wat betreft de stand van CH_3 aan C^{10} en van H aan C^5 vier isomeren kunnen optreden, n.l. CH_3 en H vóór het papier (cis), CH_3 en H achter het papier

(cis), CH_3 er voor en H er achter (trans), CH_3 er achter en H er voor (trans). Iets soortgelijks is het geval bij C^8 en C^9 en bij C^{13} en C^{14}.

Na bespreking van de mogelijkheden, die zich voordoen met betrekking tot de ruimtelijke bouw, volgt thans een overzicht van de in werkelijkheid geconstateerde feiten.

Uit Röntgen-onderzoekingen is gebleken, dat de dikte van het cholesterine-molecuul 4½-5 Å bedraagt, hetgeen overeenkomt met een koolstofketen, waaruit hier en daar een CH_3-groep steekt. Het molecuul is dus tamelijk vlak en dit wijst er op dat de ringen A, B en C in zetelvorm aaneensluiten.

Verder heeft men kunnen aantoonen, dat bij het cholestanol-3 het H-atoom aan C^5 achter het vlak van teekening valt, dus trans staat t.o.v. CH_3 aan C^{10}. Dit is eveneens het geval met alle derivaten van cholestanol-3. Dat het H-atoom aan C^5 achter het vlak van teekening valt geeft men dikwijls te kennen door het voorvoegsel „allo".

Stereo-isomeer met cholestanol-3 is koprostanol-3, het bekende koprosterine. Het onderscheidt zich van cholestanol-3 alléén doordat het H-atoom aan C^5 vóór het vlak van teekening valt, dus cis staat t.o.v. CH_3 aan C^{10}. (Ring A heeft dus bij koprostanol-3 badkuip-model.) Dit is eveneens het geval met alle derivaten van koprostanol-3.

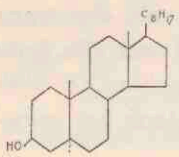
Ook heeft men aangetoond, dat bij een derivaat van koprostanol-3 het H-atoom aan C^9 achter en het H-atoom aan C^8 vóór het vlak van teekening staat; het bleek verder, dat de CH_3-groep aan C^{13} voor het vlak van teekening valt en het H-atoom aan C^{14} er achter. Aangezien deze beide laatste feiten voor derivaten van koprostanol-3 zijn vastgesteld, gelden zij voor alle afgeleiden van koprosterine en omdat het onderscheid tusschen koprostanol-3 en cholestanol-3 alleen daaruit bestaat, dat het H-atoom aan C^5 bij cholestanol achter, maar bij koprostanol vóór het vlak van teekening valt, gelden zij ook voor de derivaten van cholestanol-3.

Belangrijk is verder de stand van de OH-groep aan C^3. Cholestanol-3 draagt de OH-groep aan C^3, evenals koprostanol-3, aan de voorzijde van het molecuul. Er bestaan echter derivaten van

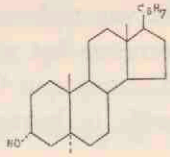
cholestanol en van koprostanol, die de OH-groep aan C^3 aan de achterzijde dragen, hetgeen men pleegt aan te geven door het voorvoegsel epi-.

Verder worden die verbindingen, die een -OH aan C^3 en een H aan C^5 aan dezelfde zijde van het molecuul dragen dikwijls van het voorvoegsel „cis" voorzien, die welke een -OH aan C^3 en een H aan C^5 niet aan dezelfde zijde van het molecuul dragen, van het voorvoegsel „trans".

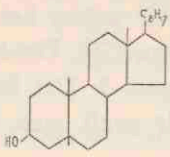
Zoo komt aan cholestanol-3 formule VI toe,
aan epi-cholestanol-3 formule VII,
aan koprostanol-3 formule VIII,
aan epi-koprostanol-3 formule IX.



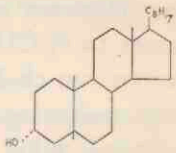
Form. VI



Form. VII



Form. VIII



Form. IX

Men is ook overeengekomen, die verbindingen welke een substituent aan C^3 dragen met "cis" te betitelen wanneer zij een van C^5 uitgaande dubbele binding bezitten, die afgeleid is van een stof, die aan C^5 een H-atoom droeg aan dezelfde zijde als de substituent aan C^3. Droeg deze een H-atoom aan de tegenovergestelde zijde, dan behoort de ervan afgeleide verbinding met een van C^5 uitgaande dubbele binding tot de „trans"-reeks. Bevindt zich de substituent aan C^{17} aan dezelfde zijde als de CH_3 aan C^{13}, dan geeft men ook dit met „cis" aan, bevindt zich de substituent aan de andere zijde, dan geeft men dit met „trans" aan.

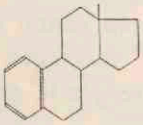
De geslachtshormonen zijn hoofdzakelijk van twee reeksen afgeleid. De eene reeks is die waartoe het cholestanol-3 behoort en, omdat de verzadigde koolwaterstof waarvan men het cholestanol-3 afgeleid kan denken, cholestaan heet, noemt men deze reeks de cholestaan-reeks. Alle ringen sluiten in zetel-model aan elkaar.

De andere reeks is die waartoe het koprostanol-3 behoort en, omdat de verzadigde koolwaterstof, waarvan men het koprostanol-3 afgeleid kan denken, koprostaan heet, noemt men deze reeks de

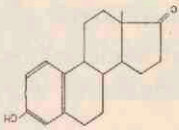
koprostaan-reeks. Hier sluit ring A in badkuip-model aan ring B, de aansluiting van de ringen B aan C en C aan D is dezelfde als bij de cholestaan-reeks.

Op blz. 50 werden de groepen der bij zoogdieren voorkomende hormonen naar hun biologische werking gekarakteriseerd. Vanuit een chemisch gezichtspunt onderscheiden zich deze groepen zich nu als volgt:

a) *de oestraangroep.* Ring A is een benzol-kern. (zie form. X). Een belangrijke vertegenwoordiger van deze groep is het oestron (Xa).

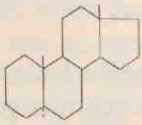


Form. X

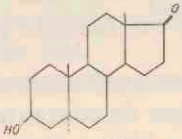


Form. Xa

b) *de androstaan-groep (XI),* vertegenwoordigd door androsteron (XIa).

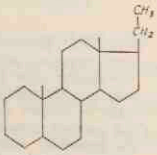


Form. XI

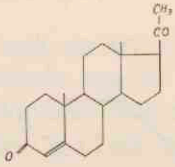


Form. XIa

c) de pregnaan-groep (XII), vertegenwoordigd door progesteron (XIIa). Ook eenige cortex-steroïden behooren hiertoe.



Form. XII



Form. XIIa

Na deze chemische inleiding kan overgegaan worden tot de behandeling van de reacties, welke door een aantal, onder de groepen a, b en c ressorteerende stoffen veroorzaakt werden.

HOOFDSTUK VIII.

OVER DE WERKZAAMHEID VAN PROGESTERON EN ZIJN DERIVATEN.

Inleiding. In de volgende vier hoofdstukken zal een overzicht gegeven worden van de groeikrommen, ijkingskrommen en concentratie-krommen, welke door toediening van een aantal zuivere hormonen en het bijnierschors-extract „Cortine" verkregen werden.

Duidelijkheidshalve wordt nog eens het volgende gedefinieerd:

1. Een *groeikromme* is een lijn, welke het verband aangeeft tusschen de legbuisgroei (in A.E.) en de tijd (in uren).

2. Een *ijkingskromme* is een lijn, welke het verband aangeeft tusschen de concentratie van een chemisch gedefiniëerde stof en de groei na een bepaald aantal uren.

3. Een *concentratiekromme* is een lijn, welke het verband aangeeft tusschen de concentratie van een chemisch niet-gedefinieerde stof, b.v. een klierextract, en de groei na een bepaald aantal uren.

Groeikrommen hebben in het algemeen de volgende vorm (zie fig. 30a, de gebogen, S-vormige lijn; de hierlangs getrokken rechte lijn blijft even buiten beschouwing). Het is mogelijk dat ook de

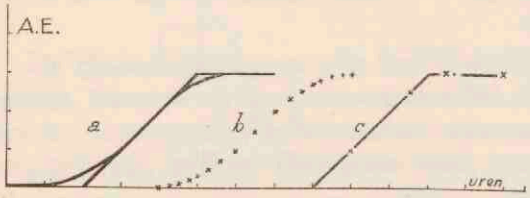


Fig. 30. Groeiprocessen verloopen meestal overeenkomstig een S-vormige lijn (a). Om de vorm van een dergelijke lijn nauwkeurig vast te stellen zou een groot aantal punten noodig zijn (b). Voor de bepaling van het verloop der in (a) geteekende hulplijn zijn de 4, in (c) geteekende, punten echter voldoende.

legbuis-groeikromme van nature S-vormig is. Zou men de buigingen der S-vormige kromme nauwkeurig willen bepalen, dan zou daarvoor een groot aantal waarnemingspunten noodig zijn (zie

fig. 30b). Omdat ieder waarnemingspunt in de legbuistest het gemiddelde van ongeveer 30 legbuismetingen voorstelt, zouden voor de constructie van een enkele groeikromme ongeveer 500 metingen noodig zijn, hetgeen op vrijwel onoverkomelijke practische bezwaren stuit. Om het aantal metingen tot het hoogst noodige te beperken werd nu een rechte lijn door de S-vormige kromme getrokken, welke samenvalt met het practisch lineaire traject dezer kromme.

Uit fig. 30a blijkt nl., dat het middengedeelte van de kromme en de rechte practisch (d.w.z. binnen de foutengrenzen) samenvallen. Dit brengt met zich mede dat, door bepaling van 4 punten als in fig. 30c weergegeven, de groei-intensiteit per tijdseenheid, alsmede de groeiduur, volkomen zijn vastgelegd. Op deze wijze kan het aantal metingen tot ongeveer een vierde teruggebracht worden, hetgeen in verband met de meer dan 20.000 metingen welke verricht moesten worden om de noodige groeikrommen der 27 onderzochte steroïden te construeeren, van belang is.

De „groeikrommen", waarvan in de volgende hoofdstukken sprake zal zijn, zijn dus feitelijk hulplijnen. Er is verder, bij het teekenen der lijnen door (en langs) de waarnemingspunten, ook steeds rekening gehouden met de waarneming, dat meestal noch de latentietijd, noch de periode van lineaire groei — binnen zekere grenzen —, van de concentratie afhankelijk zijn.

Het bestaan van één type van groeikromme voor één hormoon staat dus vrijwel vast.

Bij het construeeren der mannelijke hormoon-krommen (hoofdstuk X) was het niet steeds mogelijk voor iedere groeikromme apart te bewijzen, dat er op het 5½-uur punt een knik ligt. (Ook op andere uur-punten zou men zich in sommige gevallen een knik kunnen voorstellen).

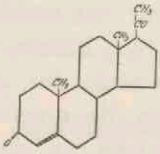
In veel gevallen is de ligging van de knik op het 5½-uur punt echter niet aan twijfel onderhevig. Uitgaande van de omstandigheid, dat één hormoon één type van groeikromme oplevert, leek het toelaatbaar in de minder zekere gevallen de knik toch op het 5½ uur punt aan te brengen.

Over de werkzaamheid van progesteron en zijn derivaten.

Zooals reeds op blz. 52 werd opgemerkt, kan de pregnaan-reeks in eenige groepen onderverdeeld worden. Hier zullen ter sprake

komen de △ 4,5- en △ 5,6-pregnenen, de allo-pregnanen en de pregnanen. Ieder dezer groepen bevat een -dion-3-20, een -olon-3-20, een -olon-20-3 en een -diol-3-20.

§ 1. Van de verschillende △-4,5-pregneenverbindingen kon er slechts een onderzocht worden, n.l. progesteron (XIII) (reeks A).



Form. XIII

I. Groeikrommen, verkregen met een △ 4,5-pregneen-verbinding.

Reeks A.

1. **△ 4,5-pregneendion-3-20 (progesteron).**

Met concentraties van 4, 6, 7½, 10, 15, 20, 25, en 30 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 31).

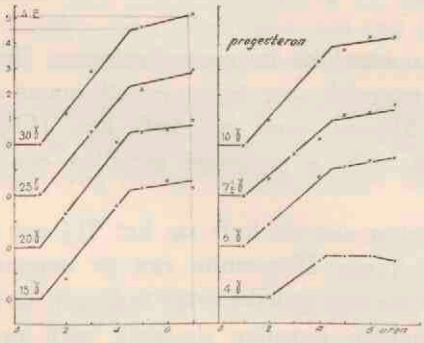


Fig. 31. Groeikrommen, verkregen met progesteron.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.
De lineaire groei eindigt na 4½ uur.
Hierna duurt de groei nog eenigermate voort.

II. IJkingskromme, verkregen met een △ 4,5-pregneen-verbinding.

Zooals uit de groeikrommen blijkt kan de ijkingskromme van progesteron het best op een proefduur van 4½ uur gebaseerd worden.

Reeks A.

1. **△ 4,5-pregneendion-3-20 (progesteron).**

De ijkingskromme, (fig. 32) is gebaseerd op de in fig. 31 weergegeven groeikrommen en representeert de lengte-toename bij de onderzochte concentraties, na 4½ uur.

Fig. 32. IJkingskromme, verkregen met progesteron.

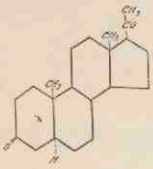
De kenmerken dezer ijkingskromme zijn :

De knik bij 9 γ en 3,9 A.E.
De hierna aanhoudende lichte stijging.

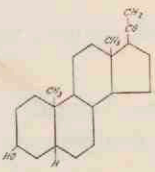
§ 2. Van de verschillende allo-pregnaan-verbindingen konden onderzocht worden:

Reeks B.

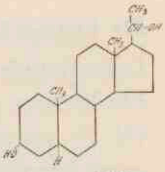
1. allo-pregnaandion-3-20 (XIV).
2. allo-pregnanol-3-on-20 (XV).
3. allo-pregnaandiol-3-20 (XVI).



Form. XIV



Form. XV



Form. XVI

III. Groeikrommen, verkregen met allo-pregnaan-verbindingen.

Reeks B.

1. **allo-pregnaandion-3-20.**

Met concentraties van 5, 10, 20, 50, 100 en 150 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 33).

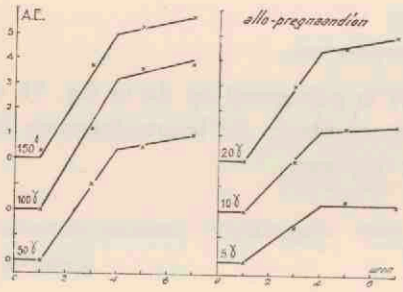


Fig. 33. Groeikrommen, verkregen met allo-pregnaandion-3.20.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.

De lineaire groei eindigt na 4 uren.

Alleen bij de hoogste concentratie duurt de groei daarna nog eenigermate voort.

2. **Allo-pregnanol-3-on-20.**

Met concentraties van 15, 40, 50, 80, 100 en 150 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 34):

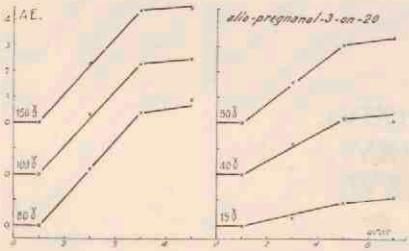


Fig. 34. Groeikrommen, verkregen met allo-pregnanol-3-on-20.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.

De lineaire groei eindigt na 5 uren.

Of de groei daarna nog eenigermate voortduurt kan hier niet goed beoordeeld worden.

3. **Allo-pregnaandiol-3-20.**

Met concentraties van 100, 200, 300, 500 en 1000 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (fig. 35) :

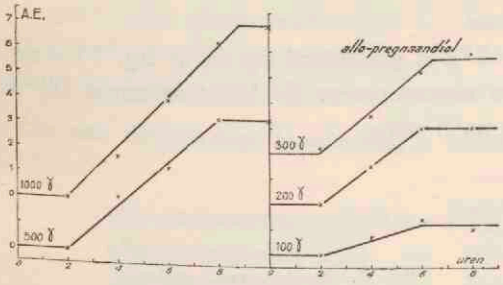


Fig. 35. Groeikrommen, verkregen met allo-pregnaandiol-3,20.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 2 uren.
De lineaire groei eindigt na 8 uren.
Alleen bij de hoogste concentratie schijnt de groei daarna nog eenigszins voort te gaan.

Vergelijkt men de in fig. 33, 34 en 35 weergegeven groeikrommen, dan blijken zij specifieke verschillen te vertoonen, op grond waarvan deze allo-pregnanen onderscheiden zouden kunnen worden.

IV. IJkingskrommen, verkregen met allo-pregnaan-verbindingen.

Reeks B.

1. **allo-pregnaandion-3-20.**

De ijkingskromme (fig. 36) is gebaseerd op de in fig. 33 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties na 4 uren.

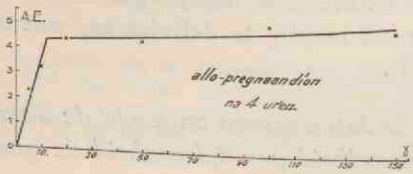


Fig. 36. IJkingskromme, verkregen met allo-pregnaandion-3,20.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn :

De knik bij 12 γ en 4,3 A.E.

De hierna aanhoudende lichte stijging.

2. **Allo-pregnanol-3-on-20.**

De ijkingskromme (fig. 37) is gebaseerd op de in fig. 34 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties na 5 uren.

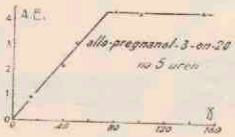


Fig. 37. IJkingskromme, verkregen met allo-pregnanol-3-on-20.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn :

De knik bij 75 γ en 4,4 A.E.

Het hierna optredende horizontale verloop.

3. **Allo-pregnaandiol-3-20.**

De ijkingskromme (fig. 38) is gebaseerd op de in fig. 35 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties na 6 uren.

Fig. 38. IJkingskromme, verkregen met allo-pregnaandiol-3,20.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn :

De knik bij 225 γ en 3,2 A.E.

De hierna aanhoudende lichte stijging.

Om de werkzaamheid der betreffende allo-pregnaan-verbindingen te kunnen vergelijken, is het noodig te definieeren, wat onder werkzaamheid begrepen wordt.

Het werkzaamste hormoon is dat, waarvan ongeacht de duur van de latentietijd, de kleinste hoeveelheid per tijdseenheid de grootste

legbuisgroei geeft, gemeten binnen het traject van de lineaire groei der groeikromme en binnen de testmarge der ijkingskromme.

De werkzaamheid kan dan verder gedefinieerd worden, als de per uur optredende groei, welke door 1 γ hormoon per 750 ccm water veroorzaakt wordt, vooropgesteld, dat de hormoonconcentratie na afloop der reactie niet merkbaar veranderd is.

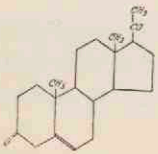
Na een eenvoudige berekening*) blijkt dan, dat de werkzaamheid van

allo-pregnaandion-3,20 = 1200×10^{-4} A.E.
allo-pregnanolon-3,20 = 140×10^{-4} A.E.
allo-pregnaandiol-3,20 = 24×10^{-4} A.E.

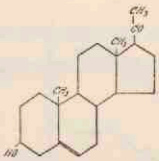
Hieruit blijkt, dat bij de allo-pregnanen, de -dion-verbinding bijna 9 maal zoo werkzaam is als de -olon-verbinding en 50 maal zoo werkzaam als de -diol-verbinding.

§ 3. Van de verschillende Δ 5,6-pregneenverbindingen konden de volgende onderzocht worden (reeks C):

1. Δ 5,6-pregneendion-3,20 (XVII).
2. Δ 5,6-pregnenol-3-on-20 (XVIII).



Form. XVII



Form. XVIII

V. Groeikrommen, verkregen met eenige Δ 5,6-pregneenverbindingen.

---

*) Voorbeeld: uit de ijkingskromme voor allo-pregnaandion blijkt, dat met 12 γ per 750 ccm. water, na 4 uren (of — onder aftrek van de latentietijd — gedurende 3 uren van lineaire groei) een lengtetoename van 4,3 A.E. heeft plaats gevonden. Per uur en per 1 γ zou de groei onder gelijke omstandigheden dus geweest zijn: $^1/_3 \times {}^1/_{12} \times 4{,}3$ A.E. = 0,119 A.E., of 1200×10^{-4} A.E.

Reeks C.

1. **△ 5,6-pregneendion-3-20.**

Met concentraties van 10, 20, 30, 40, 80 en 150 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 39) :

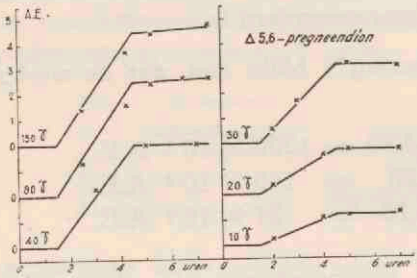


Fig. 39. Groeikrommen, verkregen met delta 5,6-pregneendion-3,20.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1½ uur.
De lineaire groei eindigt na 4½ uur.
Het hierna optredend horizontale verloop.

2. **△ 5,6-pregnenol-3-on-20.**

Met concentraties van 50, 75, 100 en 250 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 40) :

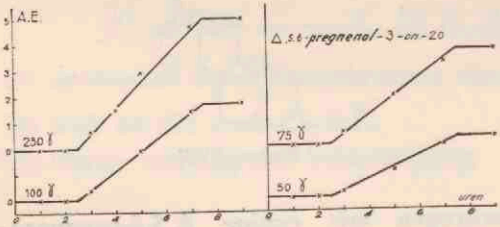


Fig. 40. Groeikrommen, verkregen met delta 5,6-pregnenol-3-on-20.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 2½ uur.
De lineaire groei eindigt na 7½ uur.
Of de groei hierna nog eenigermate voortduurt kan uit de krommen niet beoordeeld worden.

Vergelijkt men de in fig. 39 en 40 weergegeven groeikrommen, dan blijken zij specifieke verschillen te vertoonen, op grond waarvan de behandelde pregnenen onderscheiden zouden kunnen worden.

VI. IJkingskrommen, verkregen met eenige △ 5,6-pregneenverbindingen.

Reeks C.

1. **△ 5,6-pregneendion-3-20.**

De ijkingskromme (fig. 41) is gebaseerd op de in fig. 39 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties, na 4½ uur.

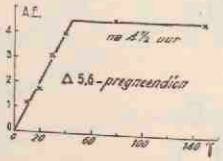


Fig. 41. IJkingskromme, verkregen met delta 5.6 pregneendion-3,20.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn:

De knik bij 45 γ en 4,5 A.E.

Het hierna optredende horizontale verloop.

2. **△ 5,6-pregnenol-3-on-20.**

De ijkingskromme (fig. 42) is gebaseerd op de in fig. 40 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties na 7½ uur.

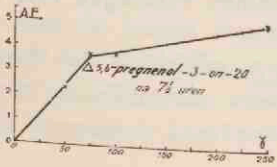


Fig. 42. IJkingskromme, verkregen met delta 5,6-pregnenol-3-on-20.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn:

De knik bij 75 γ en 3,6 A.E.

De hierna aanhoudende lichte stijging.

Na een eenvoudige berekening blijkt, dat de werkzaamheid van

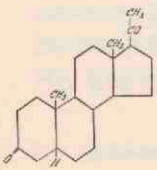
$$\Delta\ 5{,}6\text{-pregneendion-}3{,}20 = 330 \times 10^{-4}\ \text{A.E.}$$
$$\Delta\ 5{,}6\text{-pregnenolon-}3{,}20 = 100 \times 10^{-4}\ \text{A.E.}$$

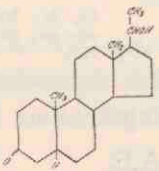
Hieruit blijkt dat bij de Δ 5,6-pregnenen, de -dion-verbinding ruim 3 maal werkzamer is dan de -olon-verbinding.

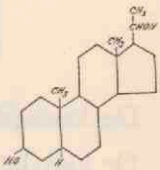
§ 4. De pregnaan-verbindingen onderscheiden zich van de allo-pregnaan-verbindingen alleen door een sterisch verschil in de plaatsing van het H-atoom aan C^5.

Van de normale pregnaan-verbindingen konden de volgende onderzocht worden (reeks D) :

1. pregnaandion (XIX).
2. pregnanol-20-on-3 (XX).
3. pregnaandiol (XXI).


Form. XIX


Form. XX


Form. XXI

VII. Groeikrommen, verkregen met pregnaan-verbindingen.

Reeks D.

1. **pregnaandion-3-20.**

Met concentraties van 25, 50, 75, 100 en 250 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 43) :

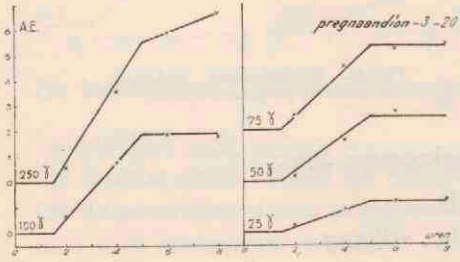


Fig. 43. Groeikrommen, verkregen met pregnaandion-3,20.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1½ uur.
De lineaire groei eindigt na 5 uren.
Alleen bij de hoogste concentratie duurt de groei daarna nog eenigermate voort.

2. **pregnanol-20-on-3.**

Met concentraties van 150, 300, 500, en 750 γ per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 44) :

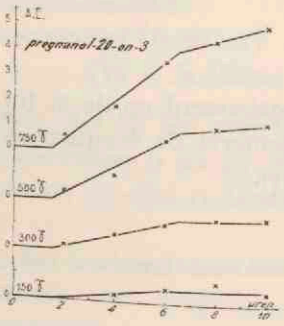


Fig. 44. IJkingskromme, verkregen met pregnanol-20-on-3.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1½ uur.
De lineaire groei eindigt na 6½ uur.
Bij de hoogere concentraties duurt de groei daarna nog eenigermate voort.

3. **pregnaandiol-3-20.**

Slechts met de hooge concentratie van 2000 γ per 750 ccm. water, werd een duidelijke reactie verkregen. Zooals uit fig. 45 blijkt, is de groeikromme waarschijnlijk van het type, dat voor mannelijke hormonen karakteristiek is.

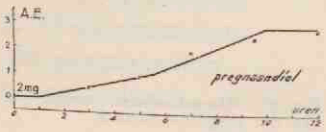


Fig. 45. IJkingskromme, verkregen met pregnaandiol-3,20.

De kenmerken dezer groeikromme zijn:

Latentietijd: 1 uur.
De lineaire groei der progesteron-phase duurt minstens 5½ uur.

Vergelijkt men de, in fig. 43, 44 en 45 weergegeven groeikrommen, dan blijken zij specifieke verschillen te vertoonen, op grond waarvan de behandelde pregnanen onderscheiden zouden kunnen worden.

VIII. IJkingskrommen, verkregen met pregnaan-verbindingen.

Reeks D.

1. **pregnaandion-3-20.**

De ijkingskromme (fig. 46) is gebaseerd op de in fig. 43 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties, na 5 uren.

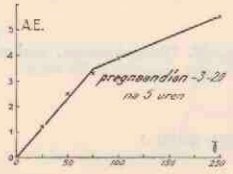


Fig. 46. IJkingskromme, verkregen met pregnaandion-3,20.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn:

De knik bij 75 γ en 3,4 A.E.
De hierna aanhoudende stijging.

2. **pregnanol-20-on-3.**

De ijkingskromme (fig. 47) is gebaseerd op de in fig. 44 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties, na 6½ uur.

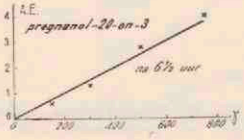


Fig. 47. IJkingskromme, verkregen met pregnanol-20-on-3.

Het kenmerk dezer ijkingskromme is:

Het oogenschijnlijk ontbreken van een knik binnen het bereik der onderzochte concentraties.

3. **pregnaandiol-3-20.**

Wegens de relatief geringe werkzaamheid kon geen ijkingskromme worden opgesteld.

Berekent men de werkzaamheid dezer pregnaanverbindingen, dan blijkt het volgende:

pregnaandion	=	133×10^{-4} A.E.
pregnanolon-20,3	=	10×10^{-4} A.E.
pregnaandiol (1e phase)	=	1×10^{-4} A.E.
„ (1e + 2e phase)	=	2×10^{-4} A.E.

Hieruit blijkt, dat bij de pregnanen de -dion-verbinding ruim 13 maal zoo werkzaam is als de -olon-verbinding, en 65—130 maal zoo werkzaam als de -diol-verbinding.

§ 5. Over het verband tusschen de biologische werking en de constitutie van pregneen-, allo-pregnaan- en pregnaanverbindingen.

Uit het voorafgaande blijkt, dat er een verband bestaat tusschen de werkzaamheid en de chemische constitutie, welke aldus geformuleerd kan worden:

Bij de pregnenen, pregnanen en allo-pregnanen zijn de dion-verbindingen steeds werkzamer dan de -olon-verbindingen. Op hun beurt zijn de -olon-verbindingen steeds werkzamer dan de -diol-verbindingen.

Men kan nu ook de werkzaamheid vergelijken van overeenkomstige △ 4,5- en △ 5,6-pregnenen, benevens de overeenkomstige allo-pregnanen en pregnanen. Dan wordt de opstelling als volgt:

Reeks E.

△ 4,5-pregneendion	=	1240×10^{-4} A.E.
△ 5,6-pregneendion	=	330×10^{-4} A.E.
allo-pregnaandion	=	1200×10^{-4} A.E.
pregnaandion	=	133×10^{-4} A.E.

Reeks F.

Δ 5,6-pregnenol-3-on-20	=	100×10^{-4} A.E.
allo-pregnanol-3-on-20	=	140×10^{-4} A.E.
pregnanol-20-on-3	=	10×10^{-4} A.E.

Reeks G.

allo-pregnaandiol	=	24×10^{-4} A.E.
pregnaandiol (1e phase)	=	1×10^{-4} A.E.
„ (1e + 2e phase)	=	2×10^{-4} A.E.

Uit reeks E blijkt, dat van de -dion-verbindingen het Δ 4,5-pregneen bijna 4 maal werkzamer is dan het Δ 5,6-pregneen; het allo-pregnaan 9 maal werkzamer dan het pregnaan.

Uit reeks F blijkt, dat van de -olon-verbindingen het allo-pregnaan 14 maal werkzamer is dan het pregnaan en bijna $1\frac{1}{2}$ maal zoo werkzaam als het Δ 5, 6-pregneen.

Uit reeks G blijkt, dat van de -diol-verbindingen het allo-pregnaan 12—24 maal werkzamer is dan het pregnaan.

Wegens ontbreken van materiaal konden niet alle pregnenolonen en -diolen onderzocht worden.

De beïnvloeding der werkzaamheid door vervanging van =O door -OH kan bestudeerd worden bij de volledige allo-pregnaan- en pregnaan-reeksen H en K.

Reeks H.

allo-pregnaandion	=	1200×10^{-4} A.E.
allo-pregnanolon	=	140×10^{-4} A.E.
allo-pregnaandiol	=	24×10^{-4} A.E.

Hieruit blijkt:

-dion = 9 $\times$ -olon = 6 $\times$ -diol.

De werkzaamheid der allo-pregnanen is blijkbaar afhankelijk van het aantal =O-groepen. Wordt één =O door een -OH vervangen, dan wordt de werkzaamheid 9$\times$ verzwakt. Wordt ook de tweede =O door -OH vervangen, dan treedt nog een 6-voudige verzwakking op.

Onderwerpt men de pregnaandion-reeks aan een soortgelijke beschouwing, dan blijkt:

Reeks K.

pregnaandion	=	133×10^{-4} A.E.
pregnanolon	=	10×10^{-4} A.E.
pregnaandiol (1e phase)	=	1×10^{-4} A.E.
,, (1e + 2e phase)	=	2×10^{-4} A.E.

Hieruit blijkt:

-dion = 13 × -olon = 5—10 × -diol.

Ook de werkzaamheid der pregnanen blijkt afhankelijk te zijn van het aantal =O-groepen. Wordt één =O door een -OH-groep vervangen, dan wordt de werkzaamheid 13× verzwakt. Wordt ook de tweede =O door een -OH vervangen, dan treedt nog een 5 tot 10-voudige verzwakking op.

Vergelijkt men de werkzaamheid der allo-pregnanen met de overeenkomstige pregnanen, dan blijkt:

Reeks L.

allo-pregnaandion	=	9 × pregnaandion.
allo-pregnanolon	=	14 × pregnanolon.
allo-pregnaandiol	=	12-24 × pregnaandiol.

In dit laatste geval is het de sterische verplaatsing van het H-atoom aan C^5, dat verantwoordelijk is voor de verschillen in werkzaamheid.

Hoewel het nog niet mogelijk was voor alle △ 4,5- en △ 5,6-pregneen-reeksen de verhouding in werkzaamheid te onderzoeken, mag men verwachten, dat de werkzaamheid ook voor de niet-onderzochte verbindingen hoofdzakelijk aan de =O verbonden is, zoodat de -dion-verbinding werkzamer is dan de overeenkomstige -olon-verbinding en deze op haar beurt werkzamer dan het -diol.

Ook het effect van het verspringen der dubbele binding van 4,5 naar 5,6 zal bij de niet-onderzochte verbindingen vermoedelijk een verzwakking der werkzaamheid ten gevolge hebben.

Behalve de werkzaamheid kan men ook trachten de *werkingsduur* in verband te brengen met de constitutie. Definieert men de werkingsduur als het aantal uren van lineaire groei, dan vindt men voor de allo-pregnanen de volgende waarden:

Reeks M.

allo-pregnaandiol = 6 uren.
allo-pregnanolon = 4 uren.
allo-pregnaandion = 3 uren.

Hieruit blijkt:

-diol = 1,5 × -olon = 1,3 × -dion.

Voor de pregnanen geldt:

Reeks N.

pregnaandiol = 9 uren.
pregnanolon = 5 uren.
pregnaandion = 3½ uren.

Hieruit blijkt:

-diol = 1,8 × -olon = 1,4 × -dion.

Bij de allo-pregnanen en de pregnanen is de werkingsduur dus wederom afhankelijk van het aantal =O- of -OH-groepen. Wordt één -OH door een =O vervangen, dan wordt de werkingsduur ongeveer 1½ maal verkort. Wordt ook de tweede -OH door een =O vervangen, dan wordt de werkingsduur wederom ongeveer 1½ maal korter.

Vergelijkt men de werkingsduur der allopregnanen met die der overeenkomstige pregnanen, dan verkrijgt men de volgende reeks:

Reeks O.

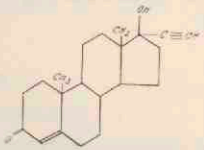
pregnaandiol = 1,50 × > allo-pregnaandiol.
pregnanolon = 1,25 × > allo-pregnanolon.
pregnaandion = 1,17 × > allo-pregnaandion.

Ook de sterische verplaatsing van het H-atoom aan C^5 bewerkstelligt dus een verandering in werkingsduur.

De vraag of er ten aanzien van de werkzaamheid der pregnaan- en pregneen-verbindingen bij de warmbloedige dieren soortgelijke eenvoudige relaties bestaan, moet ontkennend beantwoord worden.

Na de ontdekking van de specifieke werking van het progesteron op het zoogdieren-endometrium heeft men een groot aantal progesteron-derivaten onderzocht in de verwachting ook hiermede het progesteron-effect te kunnen verkrijgen. Merkwaardigerwijze bleken deze derivaten op één na volkomen onwerkzaam te zijn, waardoor het progesteron zich de naam van het meest specifieke geslachtshormoon verwierf.

Een uitzondering vormt het △ 5,6-pregnenolon, dat in een 50-voudige dosis als voor progesteron noodig is, een positieve reactie bij het konijn veroorzaakt. Onlangs is het H o h l w e g c.s. (1939) gelukt, door invoering van een aethinyl-groep het pregneninolon



F o r m. XXIIa

(XXIIa) te bereiden dat, bij subcutane injectie, $^1/_3$ maal de werkzaamheid van het progesteron bezit. (Zie groeikromme fig. 48).

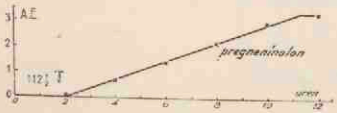


Fig. 48. Groeikromme, verkregen met pregneninolon.

In tegenstelling tot hetgeen bij de warmbloedige dieren het geval is, blijkt het bittervoorntje echter op alle tot dusver onderzochte progesteron-derivaten te reageeren. *Met het bittervoorntje is het derhalve voor het eerst mogelijk geworden, een biologische werking der bij zoogdieren onwerkzame progesteron-derivaten te bestudeeren.*

Samenvattend kan dus gezegd worden, dat het bittervoorntje op alle tot dusver onderzochte progesteron-derivaten met legbuisgroei reageert.

Zoowel de werkzaamheid als de werkingsduur dezer stoffen blijkt verband te houden met hun chemische constitutie. Steeds zijn de -dion-verbindingen werkzamer dan de -olon-verbindingen en de -olon-verbindingen werkzamer dan de -diol-verbindingen.

Voor de werkingsduur geldt dezelfde regel in omgekeerde richting. De -diolen werken langduriger dan de -olonen, en de -olonen werken wederom langer dan de -dionen.

Voor zoover onderzocht kon worden, is het Δ 4,5-pregneen werkzamer dan het overeenkomstige Δ 5,6-pregneen. De allopregnanen zijn steeds werkzamer dan de overeenkomstige pregnanen. Wederom geldt voor de werkingsduur het omgekeerde verband.

Daar de progesteron-derivaten bij het zoogdier practisch onwerkzaam zijn, is het vanuit een biochemisch standpunt beschouwd van belang, dat zij zonder uitzondering bij het bittervoorntje een legbuisreactie veroorzaken.

HOOFDSTUK IX.

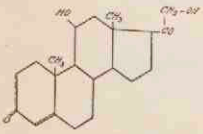
OVER DE WERKZAAMHEID VAN CORTICOSTERON EN ZIJN DERIVATEN.

Zooals reeds op blz. 53 werd opgemerkt, zijn de bijnierschorshormonen nauw verwant aan het progesteron. Vandaar, dat zij in onmiddellijke aansluiting hierop behandeld worden.

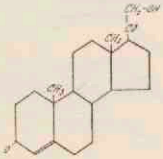
Van de cortex-steroïden werden onderzocht:

Reeks P.

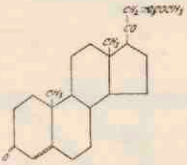
1. corticosteron (XXII)
2. desoxycorticosteron (XXIII)
3. desoxycorticosteron-acetaat (XXIV)



Form. XXII



Form. XXIII



Form. XXIV

Corticosteron onderscheidt zich van progesteron door de aanwezigheid van een primaire en een secundaire OH-groep. Desoxycorticosteron gelijkt nog meer op progesteron en onderscheidt zich hiervan slechts door de, in de zijketen voorkomende, primaire OH-groep, welke bij progesteron ontbreekt.

§ 1. **I. Groeikrommen, verkregen met eenige cortex-steroïden.**

Reeks P.

1. **Corticosteron.**

Met concentraties van 200, 400, 600 en 750 γ per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 49).

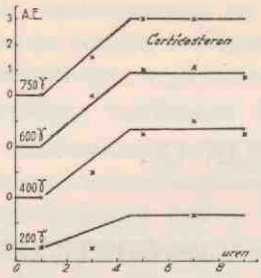


Fig. 49. Groeikrommen, verkregen met corticosteron.

Wegens gebrek aan materiaal konden niet voldoende proeven genomen worden. De kenmerken dezer groeikromme zouden kunnen zijn:

Latentietijd: 1 uur.
De lineaire groei eindigt na 4½ uur.
Daarna blijft de groeikromme horizontaal.

2. **Desoxycorticosteron.**

Met concentraties van 2½, 4, 5, 7½, 10, 15, 20 en 60 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 50).

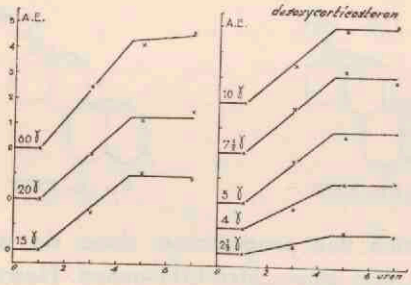


Fig. 50. Groeikrommen, verkregen met desoxycorticosteron.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.
De lineaire groei eindigt na 4½ uur.
Daarna blijft het verloop horizontaal.

3. **Desoxycorticosteron-acetaat.**

Met concentraties van ½, 1, 1½, 2, 2½, 7½, 17½, 50 en 150 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 51).

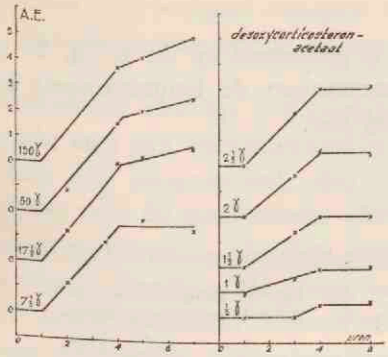


Fig. 51. Groeikrommen, verkregen met desoxycorticosteron-acetaat.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1 uur.
De lineaire groei eindigt na 4 uren.
Bij de hoogere concentraties duurt de groei daarna nog eenigermate voort.

Vergelijkt men de in fig. 49, 50 en 51 weergegeven groeikrommen, dan blijken zij specifieke verschillen te vertoonen, op grond waarvan de behandelde cortex-steroïden onderscheiden zouden kunnen worden.

II. IJkingskrommen, verkregen met corticosteron-verbindingen.

REEKS P.

1. Corticosteron.

De ijkingskromme (fig. 52) is gebaseerd op de in fig. 49 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties, na 4½ uur.

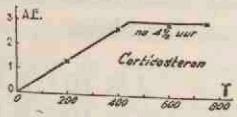


Fig. 52. IJkingskromme, verkregen met corticosteron.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn misschien:

De knik bij 450 γ en 3 A.E.
Het hierna optredende horizontale verloop.

2. **Desoxycorticosteron.**

De ijkingskromme (fig. 53) is gebaseerd op de in fig. 50 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties, na 4½ uur.

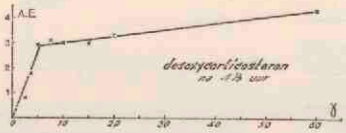


Fig. 53. IJkingskromme, verkregen met desoxycorticosteron.

De kenmerken der ijkingskromme zijn:

De knik bij 5 γ en 2,9 A.E.
De hierna aanhoudende lichte stijging.

3. **Desoxycorticosteron-acetaat.**

De ijkingskromme (fig. 54) is gebaseerd op de in fig. 51 weergegeven groeikrommen en representeert de lengtetoename bij de onderzochte concentraties na 4 uren.

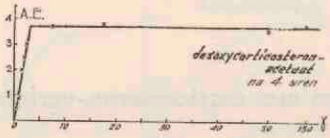


Fig. 54. IJkingskromme, verkregen met desoxycorticosteron-acetaat.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn:

De knik bij 3 γ en 3,7 A.E.
Het hierna optredende horizontale verloop.

Berekent men de werkzaamheid der behandelde corticosteronen volgens de op blz. 80 aangegeven wijze, dan blijkt:

corticosteron	$= 2 \times 10^{-3}$ A.E.
desoxycorticosteron	$= 166 \times 10^{-3}$ A.E.
desoxycorticosteron-acetaat	$= 411 \times 10^{-3}$ A.E.

Hieruit blijkt, dat desoxycorticosteron 80 en het desoxycorticosteron-acetaat 200 maal werkzamer is dan corticosteron.

§ 2. Over het verband tusschen de biologische werking en de constitutie van eenige cortex-steroïden.

Corticosteron stelt het △ 4,5-pregneen-11,21-diol-3,20-dion voor. Vergelijkt men zijn werkzaamheid met die van het △ 4,5-pregneen-3,20-dion (= progesteron), dan blijkt het corticosteron in de legbuistest ruim 60 maal minder werkzaam te zijn.

Terwijl corticosteron zich van progesteron onderscheidt door een 11- en een 21-standige OH-groep, verschilt het desoxycorticosteron (= 21-oxy-progesteron) hiervan door aanwezigheid van de 21-standige OH-groep. Desoxycorticosteron is 1,3 maal werkzamer dan progesteron.

Misschien wordt de werkzaamheid van het pregneen verzwakt door een 11-standige OH-groep, doch versterkt door een 21-standige OH-groep.

Merkwaardigerwijze is het desoxycorticosteron-acetaat nog 2½ maal werkzamer dan het desoxycorticosteron zelf.

De werkingsduur is voor de besproken corticosteron-verbindingen ongeveer gelijk en komt overeen met die van progesteron.

Vergelijkt men deze bevindingen met hetgeen omtrent de werkzaamheid der cortex-steroïden bij zoogdieren bekend is, dan kan het volgende gezegd worden.

Tegenwoordig neemt men aan, dat alle uitvalsverschijnselen, welke ontstaan na wegneming van de bijnier, door een hormoncomplex, (waaronder?) het nog steeds gezochte eigenlijke bijnierschorshormoon, opgeheven kunnen worden. Om te onderzoeken, of een bepaald hormoon volledige bijnierschorswerking bezit, kan men dus het best gebruik maken van een testmethode, waarbij de algeheele opheffing van alle uitvalsverschijnselen als criterium wordt gebruikt, b.v. de test op bijnierlooze honden. Men noemt hierbij een preparaat positief, als het in de gebruikte doseering een hond minstens 4 dagen in goede conditie kan houden.

Uit overwegingen van practische aard zijn hiernaast eenige testmethoden ontstaan, welke zich meer beperken tot de opheffing van een bepaalde groep van uitvalsverschijnselen, b..v de zwemtest op ratten en de test volgens Everse-de Fremery.

Bij de ratten-zwemtest wordt gebruik gemaakt van bijnierlooze

ratten, die zich wegens spoedig intredende vermoeienis niet zoo lang boven water kunnen houden als normale. Hierbij noemt men een preparaat positief als het bij één inspuiting een verbetering van de zwemtijd geeft.

In de Everse-de Fremery-test wordt een preparaat positief genoemd, als het gelukt door 4 dagen in te spuiten het herstelvermogen der vermoeide spier te verbeteren bij 2/3 der behandelde ratten. In deze test wordt de positieve dosis genoemd naar de per dag ingespoten hoeveelheid.

De verhouding tusschen de werkzaamheid van een bijnierschorsextract en een bijnierschorshormoon verschilt al naar gelang van de gebruikte testmethode. De werkzaamheidscoëfficient, verkregen in de hondentest, zegt het meeste ten opzichte van de volledigheid der bijnierschorswerkingen van een bepaald preparaat. Het is dus van belang na te gaan, of in de legbuistest de werkzaamheidsverhouding tusschen bijnierschors-extracten en -hormonen meer gelijkt op die in de hondentest, dan wel op die in de ratten-zwemtest of de Everse-de Fremery-test.

Van de verschillende, uit de bijnierschors geïsoleerde preparaten met bijnierschorswerking komen hier voor nadere beschouwing in aanmerking: corticosteron en desoxycorticosteron(-acetaat) waarvan de werkzaamheid onderling vergeleken wordt in de volgende tabel.

TABEL V

De werkzame grensdosis bedraagt voor corticosteron en desoxycorticosteron-acetaat (= doca) ongeveer:		verhouding:
in de ratten-zwemtest	500 γ en 500 γ	1 : 1
in de Everse-de Fremery-test	1500 γ en 60 γ	25 : 1
in de honden-test	1200 γ en 80 γ	15 : 1
in de legbuistest is de verhouding ongeveer		200 : 1

Samenvattend kan gezegd worden, dat het bittervoorntje op de tot dusver onderzochte bijnierschorshormonen met legbuisgroei reageert.

In de legbuistest is doca veel werkzamer dan corticosteron, hetgeen ook bij de overige testmethoden het geval is.

HOOFDSTUK X.

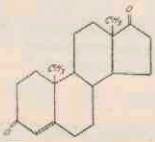
OVER DE WERKZAAMHEID DER MANNELIJKE HORMONEN.

Zooals op bl. 52 werd gezegd, behooren de mannelijke hormonen chemisch gesproken tot de androstaan-groep.

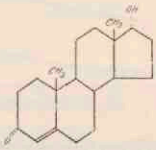
§ 1. Van de △ 4,5-androsteen-verbindingen komen voor: △ 4,5-androsteendion, △ 4,5-androstenolon en △ 4,5-androsteendiol.

Hiervan konden onderzocht worden (reeks Q) :

1. △ 4,5-androsteendion-3,17 (XXV)
2. △ 4,5-androstenol-17-trans-on-3 (testosteron), (XXVI)



Form. XXV



Form. XXVI

I. Groeikrommen, verkregen met △ 4,5-androsteen-verbindingen.

Reeks Q.

1. **△ 4,5-androsteendion-3,17.**

Met concentraties van ¼, ½, 1 en 1¾ mgr. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen. (zie fig. 55).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1 uur.
De groei eindigt na 10 uren.

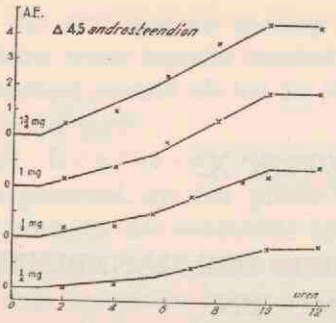


Fig. 55. Groeikrommen, verkregen met delta 4,5-androsteendion.

2. **Δ 4,5-androstenol-17-trans-on-3. (trans-testosteron).**

Met concentraties van $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1 en 2 mgr. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen. (zie fig. 56).

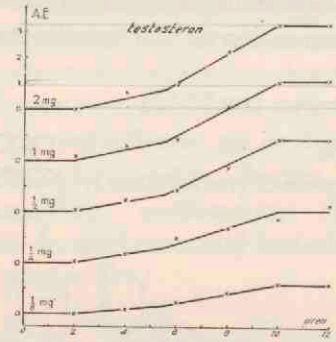


Fig. 56. Groeikrommen, verkregen met trans-testosteron (= 4,5-androstenol-17-trans-on-3).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 2 uren.

De groei eindigt na 10 uren.

II. IJkingskrommen, verkregen met Δ 4,5-androsteen-verbindingen.

Reeks Q.

1. **Δ 4,5-androsteendion-3,17.**

De ijkingskrommen (fig. 57) zijn gebaseerd op de in fig. 55 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na $5\frac{1}{2}$ en 10 uren.

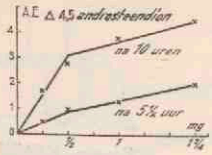


Fig. 57. Ijkingskrommen, verkregen met delta 4,5-androsteendion.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij ½ mgr en 0,9 A.E. in de 1e phase, benevens 3,1 A.E. in de 2e phase.

De hierna aanhoudende stijging.

2. **Δ 4,5-androstenol-17-trans-on-3. (trans-testosteron).**

De ijkingskrommen (zie fig. 58) zijn gebaseerd op de in fig. 56 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na 5½ en 10 uren.

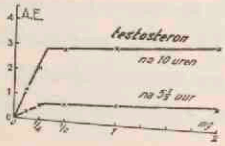


Fig. 58. Ijkingskrommen, verkregen met trans-testosteron (= delta-androstenol-17-trans-on-3).

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn:

De knik bij 5/16 mgr. en 0,7 A.E. in de 1e phase, benevens 2,9 A.E. in de 2e phase.

De hierna aanhoudende lichte stijging.

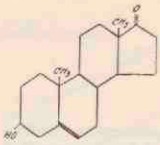
Berekent men de werkzaamheid der betreffende Δ 4,5-androsteen-verbindingen voor beide phasen afzonderlijk, overeenkomstig de op blz. 80 aangegeven wijze, dan blijkt :

	1e phase	2e phase :
Δ 4,5-androsteendion-3-17	$= 4 \times 10^{-4}$ A.E.	10×10^{-4} A.E.
Δ 4,5-androstenol-17-trans-on-3	$= 6 \times 10^{-4}$ A.E.	16×10^{-4} A.E.

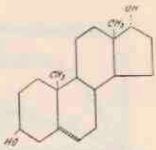
§ 2. Van de Δ 5,6-androsteenverbindingen zijn bekend: Δ 5,6-androsteendion, Δ 5,6-androstenolon en Δ 5,6-androsteendiol.

Hiervan konden onderzocht worden (reeks R) :

1. Δ 5,6-androstenol-3-trans-on-17 (XXVII)
2. Δ 5,6-androsteen-3-trans, 17-trans-diol (XXVIII)



Form. XXVII



Form. XXVIII

III. Groeikrommen, verkregen met eenige △ 5,6-androsteen-verbindingen.

Reeks R.

1. **△ 5,6-androstenol-3-trans-on-17 (trans-dehydroandrosteron).**

Met concentraties van ¼, ½, 1 en 2 mgr. per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 59).

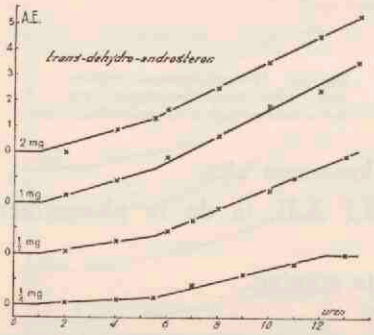


Fig. 59. Groeikrommen, verkregen met trans-dehydroandrosteron (= delta 5,6-androstenol-3-trans-17-on).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1 uur.

De groei houdt bij hoogere concentraties langer dan 12 uren aan.

2. **△ 5,6-androsteen-3-trans, 17-trans-diol.**

Met concentraties van 20 γ, $^1/_{16}$, ¼, ½ en 1 mgr. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen. (zie fig. 60).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1 uur.

De groei eindigt bij de hoogere concentraties na 12 uren nog niet.

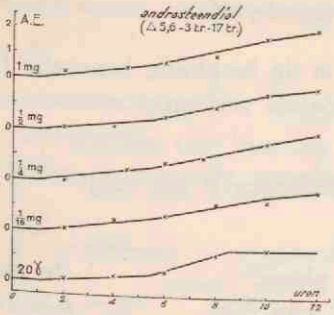


Fig. 60. Groeikrommen, verkregen met delta 5,6-androsteen-3-trans, 17 trans-diol.

IV. IJkingskrommen, verkregen met eenige Δ 5,6-androsteen-verbindingen.

Reeks R.

1. **Δ 5,6-androstenol-3-trans-on-17 (trans-dehydroandrosteron).**

De ijkingskrommen (fig. 61) zijn gebaseerd op de in fig. 59 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na 5½ en 10 uren.

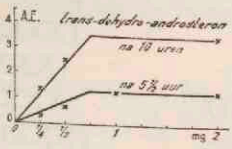


Fig. 61. IJkingskrommen, verkregen met trans-dehydroandrosteron (= delta 5,6-androstenol-3-trans-17-on).

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij ¾ mgr. en 1,3 A.E. in de 1e phase, benevens 3,5 A.E. in de 2e phase.

Het hierna optredende horizontale verloop.

2. **Δ 5,6-androsteen-3-trans, 17-trans-diol.**

De ijkingskrommen (fig. 62) zijn gebaseerd op de in fig. 60 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na 5½ en 10 uren.

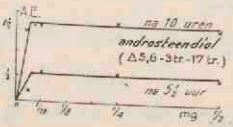


Fig. 62. IJkingskrommen, verkregen met delta 5,6-androsteen-3-trans, 17 trans-diol.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij 40 γ en 0,6 A.E. in de 1e phase, benevens 1,6 A.E. Het hierna optredenden horizontale verloop.

De werkzaamheid dezer verbindingen is als volgt :

△ 5,6-androstenol-3-trans-17-on

1e phase:	2e phase:
$= 4 \times 10^{-4}$ A.E.	$= 6 \times 10^{-4}$ A.E.

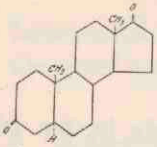
△ 5,6-androsteen-3-trans,17-trans-diol

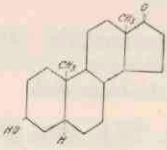
1e phase:	2e phase:
$= 78 \times 10^{-4}$ A.E.	$= 140 \times 10^{-4}$ A.E.

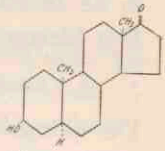
§ 3. Van de androstaan-verbindingen zijn bekend: androstaandion, androstanolon en androstaandiol.

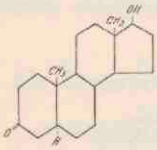
Hiervan konden onderzocht worden (reeks S.) :

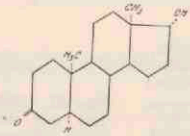
1. androstaandion-3-17 (XXIX)
2. androstanol-3-cis-on-17 (XXX)
3. androstanol-3-trans-on-17 (XXXI)
4. androstanol-17-cis-on-3 (XXXII)
5. androstanol-17-trans-on-3 (XXXIII)
6. androstaan-3-cis,17-trans-diol (XXXIV)

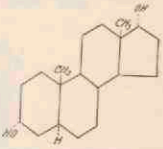

Form. XXIX


Form. XXX


Form. XXXI


Form. XXXII


Form. XXXIII


Form. XXXIV

V. Groeikrommen, verkregen met androstaan-verbindingen.

Reeks S.

1. **androstaandion-3,17.**

Met concentraties van $^1/_{16}$, $^1/_8$, $^1/_4$, $^1/_2$ en 1 mg. per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 63).

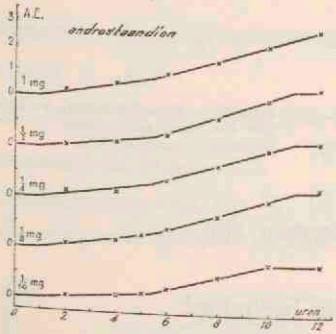


Fig. 63. Groeikrommen, verkregen met androstaandion-3,17.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.

De groei schijnt bij de hoogste concentratie na 12 uren nog niet te eindigen.

2. **androstanol-3-cis-on-17. (cis-androsteron).**

Met concentraties van $^1/_{16}$, $^1/_8$, $^1/_4$, $^1/_2$ en 1 mg. per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 64).

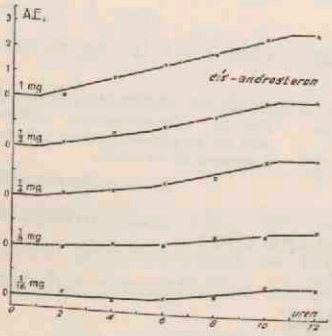


Fig. 64. Groeikrommen, verkregen met cis-androsteron (= androstanol-3-cis-on-17).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.

De groei is na 11 uren beëindigd.

3. **androstanol-3-trans-on-17 (trans-androsteron).**

Met concentraties van ⅛, ¼, ½ en 1 mgr. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 65).

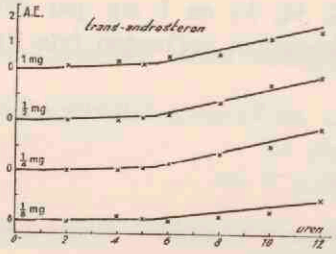


Fig. 65. Groeikrommen, verkregen met trans-androsteron (= androstanol-3-trans-on-17).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.

De groei is na 12 uren nog niet beëindigd.

4. **androstanol-17-cis-on-3 (cis-dihydro-testosteron).**

Met concentraties van ⅛, ¼, ½, 1 en 1½ mgr. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 66).

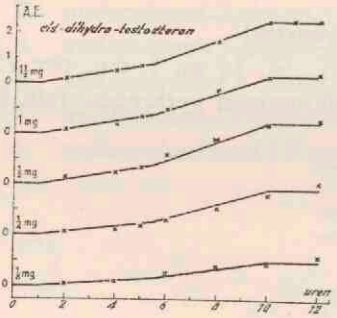


Fig. 66. Groeikrommen, verkre- met cis-dihydrotestosteron (=androstanol-17-cis-on-3).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.

De groei is na 10 uren beëindigd.

5. **androstanol-17-trans-on-3 (trans-dihydro-testosteron).**

Met concentraties van ¼, ½ en 1 mgr. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 67).

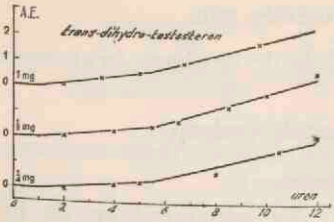


Fig. 67. Groeikrommen, verkregen met trans-dihydrotestosteron (= androstanol-17-trans-on-3).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1 uur.

De groei is na 12 uren nog niet beëindigd.

6. **androstaan-3-cis, 17-trans-diol.**

Met concentraties van $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ en 1 mgr. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 68).

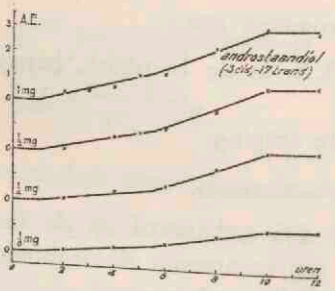


Fig. 68. Groeikrommen, verkregen met androstaandiol (= androstaan-3-cis, 17-trans).

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1 uur.

De groei is na 10 uren beëindigd.

VI. IJkingskrommen, verkregen met androstaan-verbindingen.

Reeks S.

1. **androstaandion-3, 17.**

De ijkingskrommen (fig. 69) zijn gebaseerd op de in fig. 63 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties, na $5\frac{1}{2}$ en 10 uren.

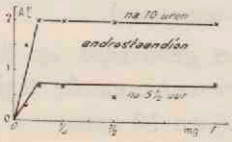


Fig. 69. IJkingskrommen, verkregen met androstaandion-3,17.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn:

De knik bij $\frac{1}{8}$ mgr. en 0,8 A.E. in de 1e phase, benevens 2,0 A.E. in de 2e phase.

Het hierna optredende, horizontale verloop.

2. **androstanol-3-cis-on-17 (cis-androsteron).**

De ijkingskrommen (fig. 70) zijn gebaseerd op de in fig. 64 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na $5\frac{1}{2}$ en 10 uren.

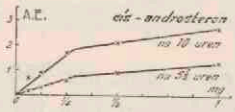


Fig. 70. IJkingskrommen, verkregen met cis-androsteron (= androstanol-3-cis-on-17).

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij $\frac{1}{4}$ mgr. en 0,8 A.E. in de 1e phase, benevens 1,8 A.E. in de 2e phase.

De hierna aanhoudende, lichte stijging.

3. **androstanol-3-trans-on-17 (trans-androsteron).**

De ijkingskrommen (fig. 71) zijn gebaseerd op de in fig. 65 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na $5\frac{1}{2}$ en 10 uren.

Fig. 71. IJkingskrommen, verkregen met trans-androsteron (= androstanol-3-trans-on-17).

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij $\frac{1}{4}$ mgr. en 0,2 A.E. in de 1e phase, benevens 1,2 A.E. in de 2de phase.

Het hierna optredende, horizontale verloop.

4. **androstanol-17-cis-on-3 (cis-dihydro-testosteron).**

De ijkingskrommen (fig. 72) zijn gebaseerd op de in fig. 66 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties, na $5\frac{1}{2}$ en 10 uren.

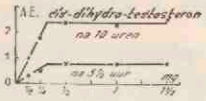


Fig. 72. Ijkingskrommen, verkregen met cis-dihydrostestosteron (= androstanol-17-cis-on-3).

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij $^5/_{16}$, mgr. en 0,8 A.E. in de 1e phase, benevens 2,4 A.E. in de 2e phase.
Het verdere horizontale verloop.

5. **androstanol-17-trans-on-3 (trans-dihydro-testosteron).**

De ijkingskrommen (fig. 73) zijn gebaseerd op de in fig. 67 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties, na 5½ en 10 uren.

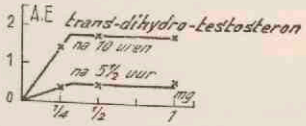


Fig. 73. Ijkingskrommen, verkregens met trans-dihydrotestosteron (= androstanol-17-trans-on-3).

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij $^5/_{16}$ mgr. en 0,5 A.E. in de 1e phase, benevens 1,8 A.E. in de 2e phase.
Het verdere horizontale verloop.

6. **androstaan-3-cis, 17-trans-diol.**

De ijkingskrommen (fig. 74) zijn gebaseerd op de in fig. 68 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties, na 5½ en 10 uren.

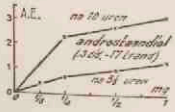


Fig. 74. Ijkingskrommen, verkregen met androstaan-3-cis, 17-trans -diol.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

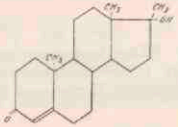
De knik bij ¼ mgr. en 0,7 A.E. in de 1e phase, benevens 2,3 A.E. in de 2e phase.
De hierna aanhoudende, lichte stijging.

De werkzaamheid dezer verbindingen is als volgt:

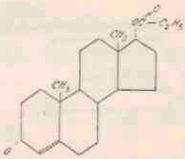
	1e phase:	2e phase:
Androstaandion-3-17	$= 14 \times 10^{-4}$ A.E.	21×10^{-4} A.E.
Androstanol-3-cis-on-17	$= 6 \times 10^{-4}$ A.E.	11×10^{-4} A.E.
Androstanol-3-trans-on-17	$= 2 \times 10^{-4}$ A.E.	9×10^{-4} A.E.
Androstanol-17-cis-on-3	$= 6 \times 10^{-4}$ A.E.	11×10^{-4} A.E.
Androstanol-17-trans-on-3	$= 4 \times 10^{-4}$ A.E.	9×10^{-4} A.E.
Androstaan 3-cis, 17 trans-diol	$= 6 \times 10^{-4}$ A.E.	14×10^{-4} A.E.

§ 4. Tenslotte werden nog eenige testosteron-derivaten onderzocht (reeks T):

1. 17-methyltestosteron (XXXV)
2. testosteronpropionaat (XXXVI)



Form. XXXV



Form. XXXVI

VII. Groeikrommen, verkregen met eenige testosteron-derivaten.

Reeks T.

1. **17-methyltestosteron.**

Met concentraties van ¼, ½ en 1 mg. per 750 ccm. water, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 75).

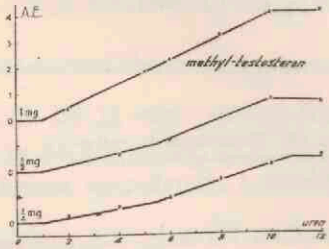


Fig. 75. Groeikrommen, verkregen met methyltestosteron.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 1 uur.

De groei eindigt na 10 uren.

2. **testosteronpropionaat.**

Met concentraties van ¼, ½, 1 en 2 mg. per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 76) :

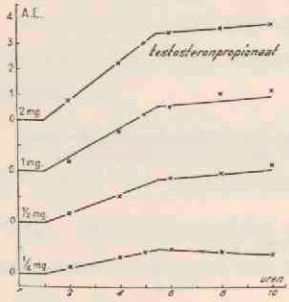


Fig. 76. Groeikrommen, verkregen met testosteronpropionaat.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 1 uur.

De kromme vertoont niet de voor de mannelijke hormonen typische knik op het 5½-uur-punt.

De groei is na 5½ uur beëindigd.

VIII. IJkingskrommen, verkregen met eenige testosteronderivaten.

Reeks T.

1. **17-methyltestosteron.**

De ijkingskrommen (fig. 77) zijn gebaseerd op de in de fig. 75 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties, na 5½ en 10 uren.

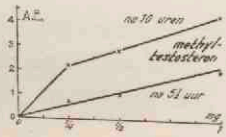


Fig. 77. IJkingskrommen, verkregen met methyltestosteron.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn:

Het ontbreken van de knik bij ¼ mg en 0,6 A.E. in de 1e phase, de wel aanwezige knik bij 2,2 A.E. in de 2e phase.

De hierna optredende stijging.

2. **testosteronpropionaat.**

De ijkingskromme (fig. 78) is gebaseerd op de in fig 76 weergegeven groeikrommen en representeert de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties, na $5\frac{1}{2}$ uur.

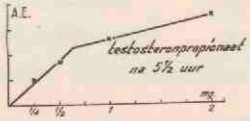


Fig. 78. IJkingskromme, verkregen met testosteronpropionaat.

De kenmerken dezer ijkingskromme zijn:

De knik bij $\frac{5}{8}$ mg. en 2,3 A.E.
De hierna aanhoudende stijging.

De werkzaamheid dezer verbindingen is als volgt:

	1e phase:	2e phase:
Methyltestosteron	$= 5 \times 10^{-4}$ A.E.	14×10^{-4} A.E.
Testosteronpropionaat	$= 82 \times 10^{-4}$ A.E.	—— A.E.

§ 5. Over het verband tusschen de biologische werking en de constitutie van androsteen- en androstaan-verbindingen.

Bij het onderzoek naar het verband tusschen de werkzaamheid (zie definitie op blz. 80) en de constitutie der onderzochte adrosteen- en androstaan-verbindingen, dienen de beide groeiphasen afzonderlijk beschouwd te worden.

Vergelijkt men de werkzaamheid der onderzochte △ 4,5-androstenen, dan blijkt volgens blz. 101, dat △ 4,5-androsteendion zoowel in de 1e als in de 2e phase, bijna zoo werkzaam is als transtestosteron.

Vergelijkt men de werkzaamheid der onderzochte △ 5,6-androstenen, dan blijkt volgens blz. 104, dat trans-dehydroandrosteron zoowel in de 1e als in de 2e phase slechts $^1/_{20}$ maal de werkzaamheid heeft van △ 5,6-androsteendiol.

Vergelijkt men de werkzaamheid der onderzochte androstaan-verbindingen, dan kan dit geschieden op grond van de 4 volgende, (meerendeels nog incomplete) reeksen.

Reeks I. Volgens blz. 110 is androstaandion in de 1e phase 3 en in de 2e phase 2 maal zoo werkzaam als cis-androsteron. Deze stof is in de 1e en 2e phase ongeveer even werkzaam als androstaan-3-cis-17-trans-diol.

Reeks II. Androstaandion is in de 1e phase bijna 8 en in de 2e phase 2 maal zoo werkzaam als trans-androsteron.

Reeks III. Androstaandion is in de 1e en in de 2e phase ongeveer 2 maal zoo werkzaam als cis-dihydrotestosteron.

Reeks IV. Androstaandion is in de 1e phase bijna 4 en in de 2e phase ruim 2 maal zoo werkzaam als trans-dihydrotestosteron.

Op grond van het bovenstaande kan het verband tusschen de biologische werking en de constitutie van androsteen- en androstaan-verbindingen als volgt geformuleerd worden.

a) Bij de onderzochte androstenen is de -dion-verbinding in beide phasen minder werkzaam dan de -olon-verbinding. Op hun beurt, zijn de -olon-verbindingen minder werkzaam dan de -diol-verbinding.

b) Bij de onderzochte androstanen is de -dion-verbinding in beide phasen steeds werkzamer dan de -olon-verbindigen. Deze -olon-verbindingen zijn echter minder werkzaam dan de -diol-verbinding.

De werkzaamheid der androstenen en androstanen is blijkbaar niet direct afhankelijk van het aantal =O groepen. Wordt één der beide =O's door een -OH vervangen, dan wordt de werkzaamheid nu eens versterkt (androstenen), dan weer verzwakt (androstanen). Wordt ook de tweede =O door een -OH vervangen, dan wordt de werking bij de androstenen versterkt, doch bij de androstanen verzwakt.

Beschouwt men de invloed van de sterische ligging der binding aan C^3 en C^{17}, dan blijkt dat bij de isomere androstanolonen de 3-cis-verbinding vrijwel even werkzaam is als de 17-cis-verbinding.

De 3-trans- is echter minder werkzaam dan de 17-trans-verbinding. De 3-cis-verbinding is duidelijk werkzamer dan de 3-trans-verbinding. Hetzelfde geldt voor de 17-cis- t.o.v. de 17-trans-verbinding.

Vergelijkt men tenslotte, voor zoover dit mogelijk is, de werkzaamheid van overeenkomstige verbindingen uit de △ 4,5- en △ 5,6-androsteen- benevens de androstaan-reeks, dan blijkt :

a) van de -dion-verbindingen is het androstaan werkzamer dan het △ 4,5-androsteen;

b) van de -olon-verbindingen zijn de androstanen ongeveer even werkzaam als het onderzochte △ 5,6-androsteen, doch minder werkzaam dan het onderzochte △ 4,5-androsteen;

c) van de onderzochte -diol-verbindingen is het androstaan minder werkzaam dan het △ 5,6-androsteen.

De vraag, of er bij de androsteen- en androstaan-verbindingen een eenvoudige relatie bestaat tusschen constitutie eenerzijds en werkzaamheid bij het bittervoorntje anderzijds, moet ontkennend beantwoord worden. Dit geldt overigens ook ten aanzien van de warmbloedige dieren.

TABEL VI

mannelijk werkende stoffen	gerangschikt naar hun afnemende werking op de:			
	ratten-zaadblaas	kapoenen-kam	bittervoorn-hypophyse	
			1e phase	2e phase
4,5-androsteendion	3	5-6	3	1-3
4,5-androstenolon, 17 tr. .	1	1	6-8	1-3
5,6-androstenolon, 3 tr. . .	8	7	1	1-3
5,6-androsteendiol, 3 tr, 17 tr.	7	9	2	4
androstaandion	6	5-6	4-5	8-9
androstanolon, 3 cis . . .	5	4	6-8	8-9
androstanolon, 17 cis . . .	9-10	8	4-5	5-6
androstanolon, 3 tr. . . .	9-10	10	10	10
androstanolon, 17 tr. . . .	2	2-3	9	7
androstaandiol, 3 cis, 17 tr.	4	2-3	6-8	5-6

Omdat de werking der tot nog toe onderzochte steroïden bij het bittervoorntje over de hypophyse-voorkwab loopt, bepaalt men met de legbuistest eigenlijk de mate van hypophyse-werking. Hierdoor opent zich de mogelijkheid de mannelijke hormonen te rangschikken naar hun werkzaamheid op de hypophyse-voorkwab en deze rangorde te vergelijken met die, welke door R u z i c k a c.s. opgesteld is voor de werkzaamheid in de kam- en zaadblaastest. Zie tabel VI.

Men ziet, dat geen der reeksen onderlinge overeenstemming vertoont, zoodat de mannelijke hormonen ten opzichte van de bittervoorn-hypophyse een andere werkzaamheid blijken te bezitten dan ten opzichte van de zaadblaas en de kapoenenkam.

Samenvattend kan dus gezegd worden, dat het bittervoorntje op alle tot nog toe onderzochte mannelijk werkende stoffen met legbuisgroei reageert. Op een enkele uitzondering na vallen de groeikrommen uiteen in twee phasen.

Er kon geen duidelijk verband tusschen de werkzaamheid en de chemische constitutie gevonden worden.

Een aantal mannelijk werkende stoffen werd naar hun werkzaamheid op de bittervoorn-hypophyse gerangschikt. Er bleek geen verband te bestaan tusschen de werkzaamheid op de visschen-hypophysevoorkwab, de zaadblaas en de kapoenenkam.

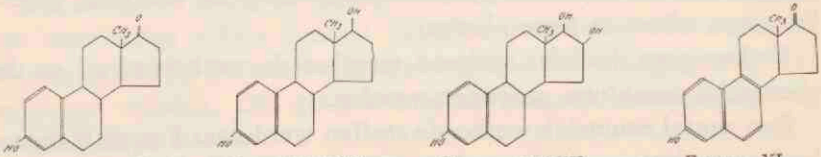
Merkwaardigerwijze levert testosteronpropionaat een progesteron-achtige groeikromme op.

HOOFDSTUK XI.

OVER DE WERKZAAMHEID DER OESTROGENE HORMONEN.

De oestrogene hormonen behooren chemisch gesproken tot de oestraan groep.

§ 1. Van de oestraan-verbindingen werden onderzocht: oestron, oestradiol, oestriol en equilenine, waarvan de formules onder XXXVII—XL zijn weergegeven.



Form. XXXVII Form. XXXVIII Form. XXXIX Form. XL

I. Groeikrommen, verkregen met oestraan-verbindingen.

Reeks U.

1. **oestron.**

Met concentraties van 20, 250, 1500 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 79).

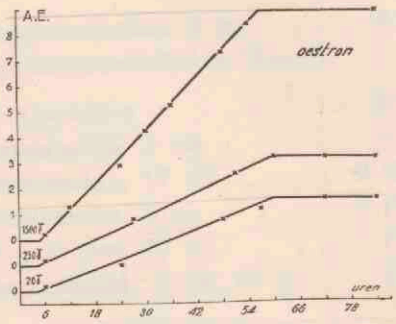


Fig. 79. Groeikrommen, verkregen met oestron.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 5½ uur.
De groei eindigt na 60 uren.

2. **oestradiol.**

Met concentraties van 12½, 25, 250 en 500 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 80).

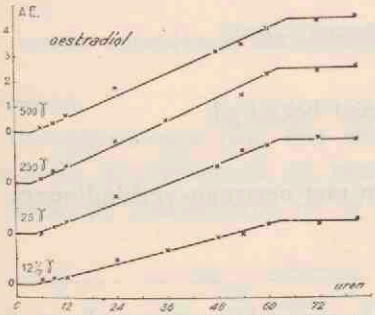


Fig. 80. Groeikrommen, verkregen met oestradiol.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 5½ uur.
De groei eindigt na ongeveer 60 uren.

3. **oestriol.**

Met concentraties van 25, 500, 1000 en 1500 γ per 750 ccm. water werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 81).

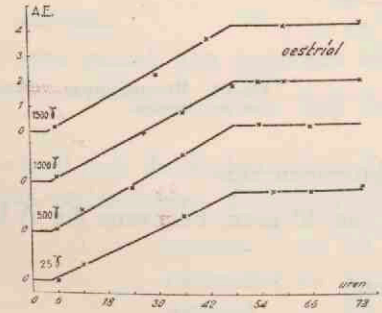


Fig. 81. Groeikrommen, verkregen met oestriol.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 5½ uur.
De groei eindigt na 48 uren.

4. **equilenine.**

Met een concentratie van 1250 γ per 750 ccm. water werd de volgende groeikromme verkregen (zie fig 82).

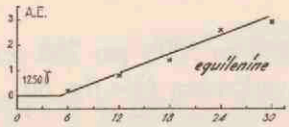


Fig. 82. Groeikromme, verkregen met equilenine.

De kenmerken dezer groeikromme zijn:

Latentietijd: 5½ uur.

De groei is na 30 uren nog niet beëndigd.

II. IJkingskrommen, verkregen met oestraan-verbindingen.

Reeks U.

1. **oestron.**

De ijkingskrommen (fig. 83) zijn gebaseerd op de in fig. 79 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na 30 en 60 uren.

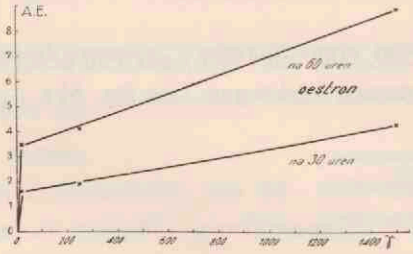


Fig. 83. IJkingskrommen, verkregen met oestron.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn:

De knik bij 20 γ en 1,6 A.E. na 30 uren, benevens 3,4 A.E. na 60 uren.

De hierna aanhoudende stijging.

2. **oestradiol.**

De ijkingskrommen (fig. 84) zijn gebaseerd op de in figuur 80 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na 30 en 60 uren.

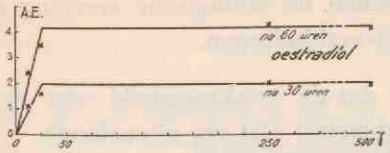


Fig. 84. IJkingskrommen, verkregen met oestradiol.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn :

De knik bij 25 γ en 2 A.E. na 30 uren, benevens 4,2 A.E. na 60 uren.

Het hierna optredende horizontale verloop.

3. **oestriol.**

De ijkingskrommen (fig. 85) zijn gebaseerd op de in fig. 81 weergegeven groeikrommen en representeeren de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na 30 en 48 uren.

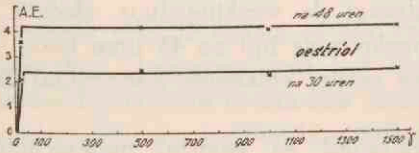


Fig. 85. IJkingskrommen, verkregen met oestriol.

De kenmerken dezer ijkingskrommen zijn:

De knik bij 30 γ en 2,4 A.E. na 30 uren benevens 4,2 A.E. na 48 uren.

Het hierna optredende horizontale verloop.

4. **equilenine.**

Wegens gebrek aan gegevens kon hiervan geen ijkingskromme opgesteld worden.

Berekent men de werkzaamheid (zie voor definitie blz. 80) dezer oestraan-verbindingen, dan blijkt het volgende :

oestron $= 3{,}1 \times 10^{-3}$ A.E.
oestradiol $= 3{,}1 \times 10^{-3}$ A.E.
oestriol $= 3{,}3 \times 10^{-3}$ A.E.

Er dient echter op gewezen te worden, dat de werkzaamheid van oestron misschien nog iets grooter is, in verband met de omstandigheid, dat het knikpunt in de ijkingskromme (dus de ligging van de test-marge) niet nauwkeurig genoeg is vastgesteld.

§ 2. Over het verband tusschen de biologische werking en de constitutie van oestraan-verbindingen.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de werkzaamheid van oestron, oestradiol en oestriol in de legbuistest niet ver uiteenloopt.

Verder blijkt, dat op grond van de groei- en concentratie-krommen, duidelijk onderscheid gemaakt kan worden tusschen de drie genoemde hormonen. Bij oestron, dat één =O en één -OH bevat, bedraagt de werkingsduur ongeveer 60 uren. De knik in de ijkingskromme ligt na 60 uren betrekkelijk laag, n.l. bij 3,4 A.E., doch buiten de testmarge stijgt de kromme nog zeer aanzienlijk. Bij oestradiol, dat twee -OH-groepen bevat, bedraagt de werkingsduur eveneens ongeveer 60 uren, doch de knik in de ijkingskromme ligt na 60 uren betrekkelijk hoog, n.l. bij 4,2 A.E., terwijl de ijkingskromme verder volkomen horizontaal blijft loopen. Bij oestriol, dat drie -OH groepen bevat, bedraagt de werkingsduur slechts 48 uren. Het knikpunt in de ijkingskromme ligt na 48 uren hoog, n.l. bij 4,2 A.E., terwijl de kromme verder volkomen horizontaal blijft loopen.

Oestron kan dus van oestradiol en oestriol onderscheiden worden op grond van de ijkingskromme, waarvan het tweede deel na het knikpunt sterk stijgt. Oestriol kan van oestron en oestradiol onderscheiden worden doordat de werkingsduur niet 60, doch 48 uren bedraagt.

Bij de zoogdieren kunnen de genoemde 3 hormonen slechts op grond van de werkzame grensdosis onderscheiden worden, de werkingen zelf onderscheiden zich niet.

Verder dient men voor oogen te houden, dat de reacties op de oestrogene hormonen bij het bittervoorntje over de hypophyse loopen en dat deze hormonen geen directe werkingen op de legbuis hebben. Ook bij het zoogdier zijn behalve de directe werkingen, indirecte werkingen via de hypophyse-voorkwab bekend. Evenals bij het bittervoorntje kunnen de oestrogene hormonen bij jonge ratten een uitstorting van het luteïniseeringshormoon bewerkstelligen, waardoor corpus luteum-vorming plaats vindt (Hohlweg, 1934).

HOOFDSTUK XII.

DE WERKZAAMHEID DER STEROIDEN IN HET ALGEMEEN.

Het is mogelijk met sommige stoffen die zelf geen hormonen zijn, en niet tot de steroïden behooren, reacties op te wekken, welke zich in de natuur uitsluitend onder invloed van geslachtshormonen voltrekken.

Hierdoor rijst de vraag, of het vermogen een legbuisreactie te veroorzaken, (afgezien van het hypophysevoorkwab-hormoon), uitsluitend gebonden is aan een steroïd-stuctuur. De desbetreffende onderzoekingen hebben hieromtrent het volgende geleerd:

1. Anorganische zuren, zouten en basen geven geen legbuisreacties (onderzocht werden NaC1, H_2SO_4, NaOH).
2. Het alcaloïd yohimbine, dat bij vrouwelijke muizen bronst kan opwekken, geeft geen legbuisreactie.
3. Het diaethylstilbeen (XLI), dat bij knaagdieren een nog sterkere oestrogene werking bezit dan het follikelhormoon, geeft tot de bijna letale dosis van 2 mgr. per 750 ccm water geen legbuisreactie.

Form. XLI

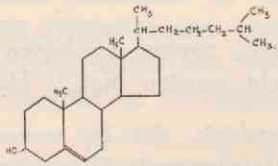
Deze omstandigheid heeft een bijzondere beteekenis in verband met het volgende:

De werking van diaethylstilbeen onderscheidt zich pharmacologisch in vrijwel geen enkel opzicht van die van het follikelhormoon.

Dit heeft ertoe geleid deze stof therapeutisch in plaats van het natuurlijke bronsthormoon te gebruiken. Ook klinisch schijnen de werkingen overeen te stemmen.

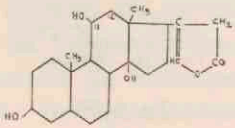
Het zal in de toekomst misschien van practisch belang zijn over een methode te beschikken, met behulp waarvan uitgemaakt kan worden, of de oestrogene werking van een bepaald (handels-)-preparaat toegeschreven moet worden aan het follikelhormoon of aan een stilbeen(-derivaat). Met de reactie volgens Allen en Doisy zullen in beide gevallen qualitatief gelijke reacties ontstaan. In de legbuistest zal alleen het follikelhormoon positief reageeren. Vooral wanneer onverhoopt mocht blijken, dat de stilbenen sterker carcinogeen werken dan het follikelhormoon, is de onderscheiding tusschen beide stoffen van meer dan theoretisch belang.

4. Cholesterine, dat het skelet der geslachtshormonen bezit, doch een lange zijketen (zie form. XLII), gaf in een hoeveelheid van 5 mgr. toegevoegd aan 750 ccm water geen legbuisgroei.



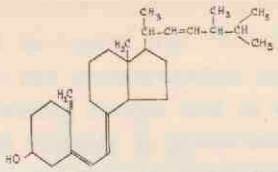
Form. XLII

5. Digoxigenine, dat eveneens het skelet der steroïden bezit, (zie form. XLIII), gaf in een hoeveelheid van 6 mgr. toegevoegd aan 750 ccm water een zwakke legbuisreactie.



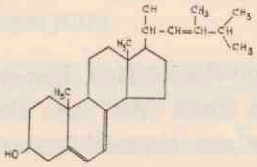
Form. XLIII

6. Ergosterine, dat ook het skelet der steroïden bezit (zie form. XLIV), gaf in een hoeveelheid van 10 mgr. toegediend aan 750 ccm water eveneens een slechts zwakke legbuisgroei.



Form. XLIV

7. Vitamine D_2, dat nauw verwant is aan de steroïden (zie form. XLV) gaf in een hoeveelheid van 2 mgr. toegediend aan 750 ccm water geen legbuisgroei.



Form. XLV

8. De pregnaan-verbindingen, blijken in de legbuistest tot de meest werkzame steroïden te behooren. Wegneming van C^{20} leidt tot de :

9. Androstaan-verbindingen, welke in de legbuistest over het algemeen aanzienlijk minder werkzaam zijn dan de pregnanen.

10. De oestraan-verbindingen onderscheiden zich door hun weinig intensieve, doch zeer sterk geprotraheerde werking.

Terwille van de overzichtelijkheid worden in tabel VII*) de kenmerken der groei- en ijkingskrommen van 27 werkzame steroïden uit de pregnaan-, androstaan en oestraan-groep vermeld.

Behalve het hypophysevoorkwab-hormoon zijn het dus, voor zoover bekend, slechts steroïden, die de legbuisgroei veroorzaken en kunstmatig bereide stoffen, die een ander skelet bezitten dan het hormoon waarmee ze in hun werking op het zoogdier overeenkomen, zullen dus in de toekomst waarschijnlijk in de legbuistest hiervan onderscheiden kunnen worden, zooals voor diaethylstilbeen reeds is aangetoond.

---

*) Deze tabel bevindt zich achter in het boek.

HOOFDSTUK XIII.

OVER DE WERKING EN ONDERSCHEIDING VAN HORMOONMENGSELS.

In klieren en lichaamsvloeistoffen komen zoo goed als steeds mengsels van hormonen voor. Wil men de legbuistest gebruiken voor de aantooning van een bepaald bestanddeel uit een niet gereinigd klierextract of een natieve lichaamsvloeistof, dan zou de legbuisreactie invloed kunnen ondervinden van de naast dit bestanddeel voorkomende steroïden. Vandaar, dat het van belang is het gedrag van hormoonmengsels nader te onderzoeken.

§ 1. DE WERKING VAN PROGESTERON PLUS FOLLIKELHORMOON.

Bij zoogdieren is het mogelijk de progesteron-werking te onderdrukken door toediening van hooge doses follikelhormoon. In de legbuistest gedraagt een mengsel van beide hormonen zich als in tabel VIII weergegeven.

TABEL VIII

uren na toediening van 10 γ progesteron + 375 γ oestradiol per 750 ccm water	opgetreden gemiddelde legbuisgroei in A.E. bij:		
	10 γ progesteron	10 γ progesteron + 375 γ oestradiol	te veel
2	1,0	1,0	0
4	3,3	3,4	0,1
5	4,0	4,2	0,2
6	4,2	4,6	0,4
7	4,3	4,7	0,4

Uit deze tabel blijkt, dat de progesteron-werking door een bijna 40-voudige hoeveelheid oestradiol niet onderdrukt wordt. Integendeel, na het verstrijken van de latentietijd voor oestradiol (= 5½ uur) is de reactie een weinig hooger dan zij voor 10 γ progesteron behoorde te zijn. Omdat blijkens de groeikrommen op bl. 119 375 γ oestradiol na 7 uren een reactie van ongeveer 0,4 A.E. geeft, krijgt men de indruk, dat dit teveel aan de oestradiol-werking toegeschreven moet worden. *In de legbuistest schijnen de progesteron- en de follikelhormoon-werkingen eenvoudig gesummeerd te worden.*

§ 2. DE WERKING VAN MANNELIJK HORMOON PLUS FOLLIKELHORMOON.

In de kapoenentest is het mogelijk de werking van mannelijk hormoon te onderdrukken door toediening van follikelhormoon. In de legbuistest gedraagt een mengsel van beide hormonen zich als in tabel IX weergegeven.

TABEL IX

uren na toediening van 1 mg dehydroandrosteron + 1 mg oestron p r 750 ccm water	opgetreden gemiddelde legbuisgroei in A.E. bij:		
	1 mg dehydroandrosteron	1 mg dehydroandrosteron + 1 mg oestron	te veel
2	0,3	0,3	0
4	0,9	1,0	0,1
6	1,6	1,7	0,1
8	2,6	2,7	0,1
10	3,7	4,1	0,4
12	4,7	5,3	0,6

Uit deze tabel blijkt, dat de dehydroandrosteron-werking door een even groote hoeveelheid oestron niet onderdrukt wordt. In de 2e phase is de reactie zelfs wat hooger dan zij voor 1 mg dehydroandrosteron behoorde te zijn. Omdat 1 mg oestron na 12 uren een reactie van ongeveer 0,6 A.E. geeft, krijgt men de indruk alsof het teveel aan de oestron-werking toegeschreven moet worden. *In de legbuistest schijnen de werkingen van mannelijk hormoon en follikelhormoon eenvoudig gesummeerd te worden.*

§ 3. DE WERKING VAN PROGESTERON PLUS MANNELIJK HORMOON.

Kort geleden werd aangetoond, dat ook door progesteron de werking van mannelijk hormoon in de kapoenentest onderdrukt kan worden (Mühlbock, 1938). Voor de met de legbuistest te verrichten onderzoekingen was het echter van meer belang te weten, of de progesteron-werking door mannelijk hormoon wordt beïnvloed. Eenige steekproeven hebben geleerd, *dat in de legbuistest geen antagonisme tuschen de werkingen van progesteron en mannelijk hormoon optreedt.*

§ 4. OVER DE MOGELIJKHEID MENGSELS VAN STEROIDEN TE ONDERSCHEIDEN.

De omstandigheid, dat mengels van steroïde hormonen reacties geven overeenkomend met de som der reacties, die ieder hormoon op zichzelf gegeven zou hebben, kan van belang zijn voor het analyseeren van sommige hormoonmengsels.

Tracht men de samenstellende bestanddeelen van niet gereinigde klierextracten en lichaamsvloeistoffen te identificeeren, dan kunnen zich de twee volgende mogelijkheden voordoen :

a) Van alle aanwezige hormonen is er slechts één in voldoende concentratie aanwezig om een legbuisreactie te geven. Naast dit werkzame bestanddeel speelt de aanwezigheid der overige hormonen dan geen rol.

b) Van alle aanwezige hormonen zijn er meerdere in een voldoende concentratie aanwezig om een legbuisreactie te geven.

In het eerste geval moeten de groei- en concentratiekrommen van het werkzame bestanddeel overeenkomen met de groei- en ijkingskrommen van het overeenkomstige chemisch zuivere hormoon.

Blijkt voor een bepaald bestanddeel en een bepaald hormoon volkomen overeenstemming te bestaan tusschen groeikrommen eenerzijds en tusschen concentratie- en ijkingskromme anderzijds, dan kan met een hooge mate van waarschijnlijkheid tot identiteit van beide substanties besloten worden.

Voorbeeld: met een lipoïd-extract uit varkens-corpora lutea konden groei- en concentratiekrommen verkregen worden, welke overeenkomen met de groei- en ijkingskrommen voor progesteron. Omdat de overige onderzochte progesteron-achtige stoffen andere groei- en/of ijkingskrommen bezitten dan progesteron, is het in hooge mate waarschijnlijk dat het werkzame bestanddeel uit genoemd extract identiek is met progesteron.

Het kan echter voorkomen, dat een bepaald werkzaam bestanddeel groei- en concentratiekrommen geeft, welke niet verkregen kunnen worden met één der onderzochte chemisch zuivere hormonen of natuurlijk voorkomende mengsels daarvan. In dat geval bestaat er aanleiding te overwegen, of het werkzame bestanddeel een nieuw hormoon voorstelt (b.v. het werkzame bestanddeel uit cortine, bl. 149 en het zgn. luteïdine, bl. 195).

In het tweede geval hangt de mogelijkheid der identificatie af van de aard en het aantal der werkzame stoffen. Op grond van de groeikrommen kan men beoordeelen of het hormoonmengsel bestaat uit:

α) een progesteron-achtig bestanddeel + mannelijk hormoon + oestrogeen hormoon.

β) mannelijk hormoon + oestrogeen hormoon.

γ) oestrogeen hormoon.

want zooals uit tabel VII, bl. 123 blijkt, kan in het onder α) vermelde geval met niet te lage concentraties na 4½ uur een reactie van meer dan 1,3—3,9 A.E. verkregen worden; in het onder β) vermelde geval kan zelfs met hooge concentraties na 4½ uur geen grootere reactie dan ongeveer 1,3 A.E. verkregen worden; in het onder γ) vermelde geval kan met hooge concentraties na 4½ uur nog in het geheel geen reactie verkregen worden.

Bestaat een hormoonmengsel uitsluitend uit follikelhormoon, dan bevat het hoofdzakelijk oestriol, wanneer de duur van de lineaire groei bij de hoogere concentraties 42 uren bedraagt, en oestradiol, wanneer deze periode 54 uren duurt en de concentratiekromme na de testmarge een horizontaal verloop heeft. Vertoont dit traject een stijging dan is de reactie het gevolg van oestron.

De reactie van mengsels van oestron, oestradiol en oestriol komt overeen met de som der afzonderlijke hormoonwerkingen.

Bestaat een hormoonmengsel uitsluitend uit natuurlijk voorkomende mannelijke hormonen, dan bevat het hoofdzakelijk testosteron, als de latentietijd 2 uren bedraagt, androsteron wanneer de latentietijd 1 uur duurt en de reactie in de 2e phase bij hoogere concentraties na 10 uren niet grooter is dan 2 A.E. Is zij daarentegen grooter (b.v. 3,5 A.E.), dan wordt de reactie door dehydroandrosteron veroorzaakt. De reactie van mengsels komt overeen met de som der afzonderlijke hormoonwerkingen.

Bestaat een hormoonmengsel hoofdzakelijk uit natuurlijk voorkomende progesteron-achtige stoffen, dan bevat het hoofdzakelijk progesteron, wanneer de groeikromme na 4½ uur nog een stijging vertoont. Is dit niet het geval en ligt de knik in de concentratiekromme na 5 uren ongeveer bij 4,4 A.E., dan wordt de reactie door allo-pregnanolon veroorzaakt. Ligt de knik na 4½ uur ongeveer bij 3 A.E., dan is de reactie het gevolg van desoxycorticosteron. Corticosteron is pas werkzaam in een dosis, die na extractie en reiniging van zeer groote hoeveelheden bijnierweefsel verkregen kan worden. Dit hormoon speelt dus practisch geen rol.

De reactie van mengsels van progesteron-achtige hormonen komt — binnen zekere grenzen — overeen met de som der afzonderlijke hormoonwerkingen.

Wanneer een hormoonmengsel behalve mannelijke en/of oestrogene hormonen, ook progesteron-achtige stoffen bevat, is de reactie in de 1e phase oorzaak, dat de reactie in de 2e phase niet geheel zuiver tot haar recht komt. (De legbuisverlenging in de 1e phase, ten gevolge van het progesteron-achtige hormoon, kan in de 2e phase n.l. in een legbuisverkorting overgaan). In dit geval kan alleen het progesteron-achtige bestanddeel goed onderscheiden worden.

Bij de onderscheiding van hormoonmengsels kan gebruik gemaakt worden van tabel VII, achterin het boek, waarin voor 27 steroïden de kenmerken der groei- en ijkingskrommen vermeld zijn.

HOOFDSTUK XIV.

BIJDRAGE TOT DE SEXUEELE ENDOCRINOLOGIE DER KOUDBLOEDIGE GEWERVELDE DIEREN.

De sexueele endocrinologie der koudbloedige, gewervelde dieren verkeert nog in embryonale toestand. Men heeft zich tot nog toe hoofdzakelijk beziggehouden met de bestudeering der uitvalsverschijnselen, welke bij sommige visschen en amphibiën optreden na extirpatie van hypophyse, testis of ovarium. In sommige gevallen heeft men getracht deze uitvalsverschijnselen op te heffen door middel van klier-tranplantaties. Uit deze onderzoekingen is gebleken, dat er ook bij koudbloedige, gewervelde dieren een verband bestaat tusschen hypophyse, gonade en secundaire geslachtskenmerken*).

Intusschen is het nog zeer de vraag, of de geslachtshormonen der koudbloedige gewervelde dieren bij de warmbloedigen werkzaam zijn, of ze dus geïdentificeerd kunnen worden met behulp van de gebruikelijke testmethoden met een warmbloedig dier als testobject. Ook is men bij het onderzoek naar de hormonale regulatie der koudbloedige dieren niet altijd even voorzichtig te werk gegaan. Zoo heeft Fleischmann eenige, bij oppervlakkige beschouwing zeer begrijpelijke, hypothesen opgesteld, welke bij nader onderzoek volkomen onjuist moesten blijken. Ter beantwoording van de vraag, of de visschen ook een hormonale regeling bezitten, heeft hij namelijk bij de keuze van het vrouwelijke bittervoorntje als proefobject zich laten leiden door de gedachte, dat de legbuis evenals de zoogdier-uterus onder de directe invloed van het follikelhormoon zou staan. In plaats van te trachten de legbuisgroei op te wekken door toediening van een

*) Een overzicht vindt men o.a. in Vergl. Physiologie der inneren Sekretion. W. Fleischmann 1937, bl. 88—96.

van de visch zelf afkomstige stof, of een extract uit ovarium of hypophyse, gaf hij follikelhormoon uit menschelijke urine. Dit veroorzaakte (men zou kunnen zeggen: toevalligerwijze) legbuisgroei. *Naar analogie van hetgeen bij de zoogdieren bekend is,* trok Fleischmann hieruit nu de conclusies:

a) dat de legbuis, evenals de zoogdier-uterus, onder de *directe* invloed van het bronstverwekkende zoogdierenhormoon staat,

b) dat dit hormoon dus als zoodanig ook door het visschenovarium geproduceerd wordt.

Zooals op blz. 46 is uiteengezet, staat de legbuis geenszins onder de directe invloed van het follikelhormoon. Integendeel, dit veroorzaakt, evenals alle ook niet-oestrogene geslachtshormonen, via de hypophyse een luteïnisatie van het ovarium, waarna pas het eigenlijke legbuisgroeihormoon (oviductine) gevormd wordt. Dit hormoon is een corpus luteumhormoon en geen follikelhormoon. Dat deze twee hormonen werkelijk verschillend zijn, wordt o.a. waarschijnlijk gemaakt door het feit dat een aetherextract uit een corpora lutea-bevattend visschenovarium (afkomstig van een Lophius piscatorius) géén groeikromme geeft, zooals voor follikelhormoon karakteristiek is, doch een, met een kortere latentietijd en groeiduur (zie fig. 86).

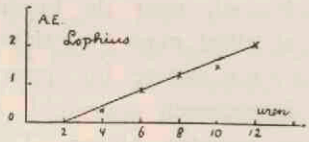


Fig. 86. Groeikromme, verkregen na toediening van het lipoïd-extract uit het ovarium van een Lophius piscatorius.

Uit het bovenstaande blijkt, dat men bij het exprimenteeren met hormonen bij verschillende diergroepen in de eerste plaats dient te onderzoeken, of de waargenomen effecten physiologisch vergelijkbaar zijn. Gelijke verschijnselen kunnen n.l. een geheel verschillende physiologische achtergrond hebben.

Begint men de endocrine secretie der koudbloedige gewervelde dieren in de eerste plaats door proefnemingen met soort-eigen

werkzame stoffen te onderzoeken, dan geeft dit een betrouwbare basis voor verder onderzoek en kan men zich beter behoeden voor ongefundeerde hypothesen.

De interessante aspecten welke het Rhodeus-onderzoek bood, hebben Jaski (1938) er toe gebracht overeenkomstige proeven met het levendbarende tandkarpertje Lebistes reticulatus te nemen. Bij zijn onderzoekingen is Jaski tot de ontdekking gekomen, dat het Lebistes-wijfje een bronstcyclus vertoont. De bronst is gekenmerkt door een typische stand, de z.g. elevatie-stand. De cyclus duurt bij 28° C. 4—6 dagen. Het gelukte Jaski het rhythme in het optreden der elevatiestanden nader te analyseeren, en een onderscheid te maken tusschen autonome en heteronome elevaties. De autonome elevaties ontstaan als gevolg van de eigen endocrine activiteit van het vrouwelijke vischje, de heteronome ontstaan door toedoen van het mannetje.

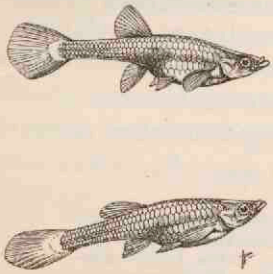


Fig. 87. Maagdelijke wijfjes zonder elevaties. Boven: zwemmend. Beneden: in rusttoestand. Volgens Jaski, 1939.

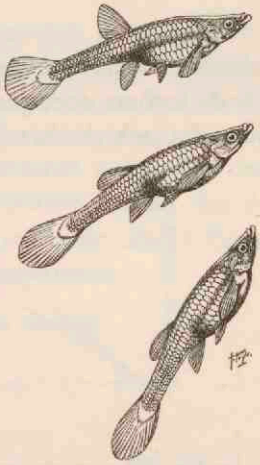


Fig. 88. Maagdelijke wijfjes met elevaties: zwemmend. Midden en beneden: twee dieren met verschillende elevatie in ruststand. Volgens Jaski, 1939.

De rol welke het mannetje hierbij speelt werd duidelijk uit de volgende proeven. Bij maagdelijke vischjes treden, onder afwezigheid van mannetjes, individueele bronst-cyclussen op. Brengt men mannetjes bij deze wijfjes, dan worden de cyclussen vanaf dit moment gecoördineerd: eenige tijd later komen dan alle wijfjes

op dezelfde dag in de elevatiestand, ongeacht de phase van de cyclus waarin zij zich bevonden toen de mannetjes werden toegevoegd. Hierdoor rees het vermoeden, dat de mannetjes een stoffelijke invloed op de wijfjes zouden uitoefenen. Werden maagdelijke wijfjes in water gedaan, waarin tevoren mannetjes hadden gezwommen, dan trad eveneens de genoemde onmiddellijke coördinatie der bronstcyclussen op. Hieruit kon afgeleid worden, dat de mannetjes in het water een stof uitscheiden, die de wijfjes in de elevatiestand brengt.

Het lag nu voor de hand te onderzoeken of het water, waarin Lebistes-mannetjes gezwommen hadden, ook een positieve legbuisreactie bij het bittervoorntje zou kunnen geven. Desbetreffende proefnemingen leerden, dat dit inderdaad het geval is!

Hiermede was voor het eerst voor een visch het exacte bewijs geleverd, dat deze een geslachtshormoon uitscheidt, hetwelk in staat is bronst bij de vrouwelijke partner op te wekken.

Thans werd de vraag gesteld, of het bronstige mannelijke bittervoorntje wellicht eveneens een bronstverwekkende stof afscheidt, die de legbuis doet groeien. Desbetreffende proefnemingen toonden aan, dat ook dit het geval is!

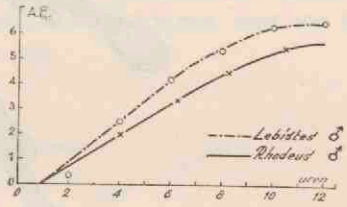


Fig. 89. Groeikrommen verkregen met water, waarin Lebistes-mannetjes, resp. Rhodeus-mannetjes hebben gezwommen.

In fig. 89 zijn de legbuisgroeikrommen weergegeven, welke verkregen werden met water, waarin uitsluitend Lebistes- of Rhodeusmannetjes hadden gezwommen. De krommen hebben een overeenkomstig verloop, zoodat in beide gevallen misschien dezelfde stof in het spel is, welke door Jaski copuline is genoemd.

Over de chemische natuur van het copuline is nog niets met zekerheid bekend. Door histologisch onderzoek wordt momenteel uitgemaakt:

a) of het een gonadotroop hormoon is; zoo niet:

b) of het — evenals de tot dusver onderzochte steroïden — via de hypophyse op het ovarium werkt; zoo niet:

c) of het misschien direct de legbuis beïnvloedt.

Het copuline geeft in de legbuistest een geheel andere groeikromme dan de bij zoogdieren voorkomende steroïde hormonen. Ondanks de omstandigheid, dat het copuline door de mannelijke sexe wordt afgescheiden, onderscheidt het zich dus van het specifieke mannelijke zoogdieren-hormoon (testosteron, androsteron, dehydroandrosteron). De groeikromme van copuline doet het meest denken aan die, welke door de pregnanen veroorzaakt worden (zie blz. 84 e.v.).

Zoowel vanuit een endocrinologisch als phylogenetisch standpunt bekeken, zou het zeer interessant zijn na te gaan, of het copuline werkzaam is bij de warmbloedigen. *)

De ontdekking van een geslachtshormoon, dat door visschen wordt uitgescheiden (Jaski), de ontwikkeling van een methode, waardoor de werking van dit hormoon bij visschen en amphibiën histologisch geanalyseerd kan worden (Bretschneider) en de mogelijkheid dit hormoon qualitatief en quantitatief te bepalen met behulp eener adaequate testmethode (de legbuistest) maakt, dat de sexueele endocrinologie der koudbloedige gewervelde dieren thans voor exact onderzoek veel toegankelijker is geworden.

*) Met deze onderzoekingen is reeds een aanvang gemaakt.

HOOFDSTUK XV.

ONDERZOEK NAAR DE WERKZAAMHEID VAN ORGAANPREPARATEN EN LICHAAMS-VLOEISTOFFEN.

Ter beantwoording van de vraag, welke zoogdier-organen stoffen bevatten, die een legbuisgroei kunnen veroorzaken werd uitgegaan van versche klieren en van gedroogde orgaanpoeders „Organon",*) waarvan 1 gram ongeveer overeenkomt met 4—5 gram versch weefsel. Het orgaanpoeder en de fijngewreven klieren werden intensief met koud water geëxtraheerd en daarna gefiltreerd. Het filtraat werd vervolgens aan het aquariumwater toegevoegd en op zijn werkzaamheid onderzocht.

§ 1. NEGATIEF REAGEERENDE ORGAANPREPARATEN.

De waterige extracten van de volgende organen veroorzaakten binnen 12 uren geen legbuisreactie :

Cerebrum
Duodenum
Epiphysis
Gaster
Hepar
Hypophysis pars posterior
Lien
Pancreas
Thymus
Thyreoïdea

*) Men dient voor oogen te houden, dat deze poeders niet geheel gelijkwaardig zijn met de versche organen waaruit zij bereid werden, omdat zij een droogingsproces hebben ondergaan en sommige ervan met aceton werden ontvet.

§ 2. POSITIEF REAGEERENDE ORGAANPREPARATEN.

De waterige extracten van de volgende organen veroorzaakten binnen 12 uren duidelijke legbuisreacties :

Glandula suprarenalis
Corpus luteum
Ovarium zonder corpora lutea of follikels
Placenta
Testis

Uit het bovenstaande blijkt, dat uitsluitend die organen, welke in verband staan met de voortplanting, benevens de bijnier, positieve legbuisreacties geven.

Van groot belang is de vraag, of de werkzaamheid der positief reageerende orgaanextracten het gevolg is van de aanwezigheid van chemisch reeds geïdentificeerde steroïden, of van nog onbekende substanties. Deze vraag zal voor ieder der onder § 2 genoemde organen in afzonderlijke hoofdstukken behandeld worden.

§ 3. POSITIEF REAGEERENDE LICHAAMSVLOEISTOFFEN.

Bloed
Vocht uit ovarium-cysten
Follikelvocht
Sperma
Urine

§ 4. NEGATIEF REAGEERENDE LICHAAMSVLOEISTOFFEN.

Vruchtwater.

Ter beantwoording van de vraag, welke lichaamsvloeistoffen substanties bevatten, die een legbuisgroei kunnen veroorzaken, werden óf de natieve vloeistoffen óf de hieruit bereide aetherextracten aan het aquariumwater toegevoegd.

De positief reageerende lichaamsvloeistoffen gaven de volgende reacties :

Bloed.

Het bloed is het transportmiddel van alle hormonen en hunne derivaten. Principiëel zal men er dus alle geslachtshormonen en hun natuurlijk voorkomende derivaten in moeten kunnen aantreffen. In werkelijkheid blijken de in het bloed voorkomende hoeveelheden echter zoo gering te zijn, dat men ze slechts in bepaalde gevallen met behulp van de gebruikelijke methoden kan aantoonen. Natuurlijk speelt hierbij de gevoeligheid der bepalingsmethode een groote rol. Zoo kan b.v. met de muis als testobject het bronsthormoon soms reeds in natief bloed aangetoond worden. Voor de aantooning van kamgroeistoffen is echter extractie van het bloed noodzakelijk. Progesteron en bijnierschorshormoon zijn tot dusverre na extractie van zelfs groote hoeveelheden bloed niet in aantoonbare hoeveelheden verkregen.

Omdat de legbuistest juist zoo gevoelig is voor progesteron en bijnierschorshormoon, leek het interessant na te gaan, of het met behulp van deze methode wellicht mogelijk is, meer over de hormonale toestand van het bloed te weten te komen.

a) *Dierlijk bloed.*

50 ccm. gedefibrineerd bloed van een drachtige koe (3½ mnd) als zoodanig toegevoegd aan 750 ccm. water gaf van 0—5½ uur 0,4 A.E. en van 5½—12 uur 0 A.E.

Hierin werd dus practisch geen hormoon gevonden.

Het aetherextract van ¼ L citraatbloed eener drachtige zeug gaf de volgende reacties :

gemiddelde legbuisgroei van 6 visschen :

na 1¼ uren	0,8 A.E.
„ 3 „	2,3 „
„ 4 „	3,8 „
„ 6¼ „	4,0 „
„ 8 „	4,3 „

Het aetherextract van 50 ccm van dit bloed gaf geen reactie.

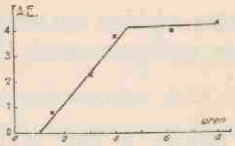


Fig. 90. Progesteron-achtige groeikromme, verkregen met een lipoïd-extract uit bloed eener drachtige zeug.

Grafisch voorgesteld (zie fig. 90) blijken deze waarden een progesteron-achtige kromme weer te geven. De werkzaamheid van 1 L. van dit bloed kwam overeen met die van 40 γ progesteron.

b) *Bloed van gravide vrouwen.*

Het bloed werd als citraatbloed aan 750 ccm water toegevoegd.

TABEL X

No. patiënte	Zwangerschaps-maand	Hoeveelheid bloed in ccm.	Reactie van 0—5½ uur in A.E.	Reactie van 5½—12 uur in A.E.
1	3	64	0,3	0
2	4	50	0	0,7
3	6	50	0	1
4	6	46	0,4	—
5	7	34	0,3	1
6	8	46	0,3	1,7
7	9	50	0	1
8	9	50	0	2

Uit het bovenstaande blijkt, dat door hoeveelheden van 50—60 ccm. bloed van zwangere vrouwen legbuisreacties veroorzaakt kunnen worden. De aard der groeikrommen kan echter pas aan de hand van extracten van grootere hoeveelheden onderzocht worden.

c) *Bloed van een geval met corpus luteum persistens.*

Een grootere hoeveelheid bloed (195 ccm.) werd verkregen van een patiënte, waarvan de ziektegeschiedenis als volgt luidt:

Tot Mei 1938 steeds regelmatig menses. Op 21-6-38, omstreeks de verwachte menstruatie slechts zeer gering bloedverlies en sedert dien amenorrhoe. Sedert begin Juli van hetzelfde jaar bijna aanhoudende pijn links, zoodat aan een persisteerend corpus luteum gedacht werd. Diathermie en yohimbine brachten geen verandering.

Bij gynaecologisch onderzoek blijkt het linker ovarium bijzonder gevoelig. Een cyste is niet te voelen. Patiënte is echter wegens vetlijvigheid bijzonder moeilijk te onderzoeken; ze weegt 106 K.G. bij een lengte van 150 cm.

In de hoop, dat het op de een of andere wijze gelukken zou op grond van den progesteronspiegel in het bloed, uitsluitsel te verkrijgen, werd 195 ccm bloed afgenomen, en met aether geëxtraheerd.

Dit extract gaf, verdeeld over 3 bakjes à 750 ccm. water de volgende gemiddelde legbuisgroei bij 9 visschen.

TABEL XI

uren na toediening	legbuisgroei in A.E.
2	0,3
4	1,9
6	2,2
8	1,7

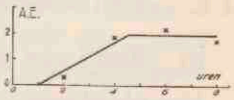


Fig. 91. Progesteron-achtige groeikromme, verkregen met een lipoïd-extract van bloed eener patiënte met corpus luteum persistens.

De in fig. 91 afgebeelde groeikromme blijkt weer een progesteron-achtige kromme te zijn. De werkzaamheid van het geheele bloedextract kwam ongeveer overeen met die van 15 γ progesteron, dus met 1 γ per 13 ccm bloed. Een dergelijke groote legbuisreactie werd tot dusverre nimmer met bloed verkregen. Er mag bij bovengenoemde patiënte dus gesproken worden van een abnormaal verhoogde hormoon-spiegel van het bloed, welke des te interessanter is, omdat inderdaad een persisteerend corpus luteum gevonden werd. Hiermede is het voor het eerst gelukt op grond van de hormonale reactie van een bloed-extract de diagnose van het corpus luteum persistens te helpen stellen. Verdere onderzoekingen zullen moeten leeren, of de methode van klinische waarde is.

d) *Bloed van niet-gravide vrouwen.*

Het bloed werd wederom als citraatbloed aan het water toegevoegd.

TABEL XII

No. patiënte	Leeftijd	Aantal dagen na eerste dag laatste menstr.	Duur v. d. cyclus in dagen	Hoeveelheid bloed in ccm.	Reactie van 0—5½ uur in A.E.	Reactie v. 5½—12 uur in A.E.
1	38	12	28	16	0	0.7
2	31	13	28	18	0.3	0
3	39	8	21—28	34	0	0,7

Het bloed van niet-gravide vrouwen veroorzaakte in hoeveelheden van 16—34 ccm. slechts een geringe legbuisgroei. Over de aard der groeikrommen kan pas iets gezegd worden aan de hand van extracten uit grootere hoeveelheden bloed.

e) *Bloed na mola-zwangerschap.*

33 ccm. bloed van een patiënte, die 1 dag tevoren van een mola bevallen was, gaf van 0—5½ uur 0,3 A.E., dus practisch geen reactie.

Dit geval is vooral van belang met het oog op het feit, dat mola-zwangerschap bijna steeds gepaard gaat met een abnormaal hooge hormoon-spiegel in bloed en urine.

Vocht uit ovarium-cysten.

Negetieve reacties werden gevonden in de volgende gevallen:

Patiënte 1.

2½ ccm. vocht uit een ovarium-cyste gaf geen reactie.

Patiënte 2.

60 ccm. van een 640 ccm. vocht bevattende ovarium-cyste gaf geen reactie.

Patiënte 3.

40 ccm. van een 850 ccm. vocht bevattende carcinomateuse ovarium-cyste gaf geen reactie.

Patiënte 4.

30 ccm. van een 600 ccm. vocht bevattende ovarium-cyste gaf geen reactie.

Positieve, progesteron-achtige reacties werden verkregen in de volgende gevallen:

Patiënte 5.

De reactie van 40 ccm. van een 800 ccm. vocht bevattende ovarium-cyste kwam overeen met die van 80 γ progesteron, of met 2 γ per ccm.

Patiënte 6.

De reactie van 36 ccm. vocht uit een ovarium-cyste kwam overeen met die van 54 γ progesteron, of met 1½ γ per ccm.

Patiënte 7.

De reactie van 60 ccm. vocht uit een ovarium-cyste kwam overeen met die van 12 γ progesteron, of met 0.2 γ per ccm. Het lipoïd-extract van de cyste-wand, welke 29,3 gram woog gaf een reactie overeenkomend met die van 21 γ progesteron, dus met 0,7 γ per gram weefsel.

Follikelvocht.

a) *Follikelvocht van niet-drachtige zeugen.*

Voor zoover het werkzaam was bleek follikelvocht progesteronachtige groeikrommen te geven.

Varken 1.

2 ovaria bevatten 20 follikels, tezamen gevuld met 2 ccm vocht, hetgeen toegevoegd aan 750 ccm water geen reactie gaf.

Varken 2.

2 ovaria bevatten 13 follikels, tezamen gevuld met 4 ccm vocht. De reactie hiervan kwam overeen met die van 8 γ progesteron, of 0,6 γ per follikel van 0,3 ccm.

Varkens (eenige).

60 ccm follikelvocht afkomstig van follikels met ca. 0,5 ccm vocht. De reactie hiervan kwam overeen met die van 480 γ progesteron, of 4 γ per follikel van 0,5 ccm.

b) *Follikelvocht van het niet-drachtige rund.*

40 ccm follikelvocht, afkomstig van groote, rijpe follikels, met een inhoud van 1—2 ccm. De reactie hiervan kwam overeen met die van 200 γ progesteron, of 5 γ per ccm.

c) *Follikelvocht uit menschelijke ovaria.*

Van vier follikels uit de ovaria van vier vrouwen werden resp. 0,3, 3, 0,3, 2 ccm, of totaal 5,6 ccm follikelvocht met een injectiespuit opgezogen. De reactie kwam overeen met die van 8 γ progesteron of 1½ γ per ccm.

Tot nog toe was het voorkomen van progesteron-achtig hormooon in follikelvocht niet bekend. Het hormoon komt echter zoowel in dierlijk als in menschelijk follikelvocht voor. Blijkbaar wordt het reeds vóór de uitstooting van het ei door de granulosa-cellen van de rijpende en rijpe follikel geproduceerd.

Sperma.

6 ccm stieren-ejaculaat, toegevoegd aan 300 ccm water gaf van 0—5½ uur 0,4 A.E. en van 5½—12 uur 0,3 A.E., als gemiddelde bij drie visschen.

Wegens de geringe reactie kan over de aard der groeikromme niets met zekerheid gezegd worden.

Urine.

a) *Urine van drachtige koeien.*

3 ccm urine van eenige drachtige koeien, toegevoegd aan 750 ccm water, gaf de volgende reacties:

TABEL XIII

Koe No.	Dracht in maanden	Reactie van 5½—12 uren in A.E.
1	4½	1,5
2	4½	1,1
3	5	0,8

b) *Urine van een drachtige merrie.*

3 ccm urine van een drachtige merrie (3e mnd.) toegevoegd aan 750 ccm water, gaf in 12 uren een reactie van 2,4 A.E.

c) *Urine van de mensch.*

De urine van gravide en niet-gravide vrouwen kan sterke reacties geven. Zie hiervoor hoofdstuk XXI.

Ook urine van mannen kan positieve reacties geven. Zie hiervoor blz. 236. De aard van het urine-bestanddeel waaraan de werkzaamheid vermoedelijk is toe te schrijven wordt op bl. 191 e.v. nader besproken.

Vruchtwater.

50 ccm vruchtwater eener gravida (verkregen door eivliessteek), toegevoegd aan 750 ccm water, gaf van 0—5½ uur 0,2 A.E. en van 5½—12 uur 0 A.E. De hormoon-concentratie in vruchtwater is blijkbaar zeer gering.

Overziet men de beteekenis van de legbuistest voor het aantoonen van werkzame bestanddeelen in verschillende lichaamsvloeistoffen dan blijkt, dat de methode goede diensten kan bewijzen bij het aantoonen van progesteron-achtig hormoon in het bloed- cyste- en follikelvocht.

De bepaling van dit hormoon in het bloed kan in geval van corpus luteum-persistentie misschien klinische beteekenis verkrijgen. De bepaling van progesteron-achtig hormoon in cyste- en follikelvocht kan van waarde zijn voor de beoordeeling der secretorische activiteit van rijpende en rijpe follikels en van verschillende vormen van ovarium-cysten.

HOOFDSTUK XVI.

BIJDRAGE TOT DE ENDOCRINOLOGIE VAN DE TESTIS.

De vroegtijdige verwijdering der beide testikels leidt bij mensch en zoogdier tot gebrekkige ontwikkeling der secundaire geslachtskenmerken. Hieruit is af te leiden, dat de testikel een of meer stoffen produceert, welke noodzakelijk zijn voor de ontwikkeling en instandhouding van het mannelijk geslachtsapparaat.

Reeds langere tijd geleden hebben verschillende onderzoekers aangetoond, dat men uit dierentestes extracten kan bereiden, die de hanekam doen groeien en bepaalde werkingen op de secundaire geslachtskenmerken van mannelijke zoogdieren uitoefenen. Uit deze extracten werd voor het eerst door David, Dingemanse, Freud en Laqueur (1935) een zeer werkzame, kristallijne stof bereid, welke testosteron werd genoemd.

Voorts komen in de testis stoffen voor, welke, zonder op zichzelf androgene invloeden uit te oefenen, de werkzaamheid van het testosteron verhoogen, zoodat de niet geheel zuivere testesextracten een relatief sterkere werking op de secundaire geslachtskenmerken van zoogdieren uitoefenen, dan het daaruit geïsoleerde zuivere hormoon alleen. De chemische natuur dezer co-substanties, welke door Dingemanse en Freud ontdekt werden, is geheel verschillend van die der geslachtshormonen. Misschien zijn het hoogere vetzuren.

Merkwaardigerwijze vindt men in de testis stoffen, die bij vrouwelijke knaagdieren bronst opwekken. Over de chemische natuur dezer stoffen is nog niets met zekerheid bekend.

Op blz. 135 werd reeds medegedeeld, dat het waterige extract uit testikels een positieve legbuisreactie veroorzaakt. In verband met het voorkomen van mannelijk en oestrogeen hormoon in de testis, zou men — ondanks de geringe oplosbaarheid dezer stoffen in water — toch kunnen verwachten, dat de legbuisgroeikromme van

het mannelijke of van het oestrogene type was, of een combinatie van beide. De volgende proef leert echter anders.

Een hoeveelheid testisweefsel werd met rivierzand fijngewreven, met water geëxtraheerd en gefiltreerd. Het filtraat van 10 gr. versche klierbrij, toegevoegd aan 750 ccm. water gaf gemiddeld de volgende reacties bij 12 visschen:

TABEL XIV

Uren na toediening	Legbuisgroei in A.E.
4	1,6
6	3,4
8	4,6
10	4,7
12	4,7

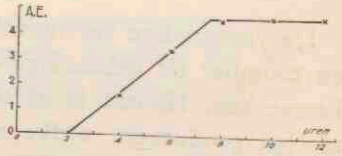


Fig. 92. Groeikromme, verkregen met waterig extract uit hengstentestes.

Uit de grafische voorstelling dezer waarden (zie fig. 92) blijkt, dat de legbuisgroei veroorzaakt wordt door een bestanddeel met een latentietijd van 2 uren. Omdat de oestrogene hormonen alle een latentie-tijd van 5½ uur bezitten, kan de legbuisgroei niet hierdoor veroorzaakt zijn. Verder mist de groeikromme de, voor de natuurlijk voorkomende mannelijke hormonen, typische knik tusschen progesteron- en oestron-phase. Ook manifesteert zich 5½ uur na toediening van het extract een grootere legbuisgroei dan ooit door de gecombineerde werking van het in 10 gr. testisweefsel aanwezige mannelijke en oestrogene hormoon bereikt kan worden. Het werkzame bestanddeel uit het testis-extract kan daarom noch testosteron, noch follikelhormoon zijn. Naar de vorm der groeikromme te oordeelen, is hier een steroïd uit de pregnaan-groep in het spel.

Deze bevinding is belangwekkend in verband met de volgende, nog niet definitief opgeloste vragen :

1. is het uit testikels geïsoleerde testosteron identiek met het door dit orgaan geproduceerde mannelijke hormoon?
2. produceert de testikel één of meer testishormonen?
3. produceert de testikel, behalve mannelijke en oestrogene stoffen nog andere, b.v. pregnaan-achtige hormonen?

Ad. 1. De bereiding van testosteron uit testikels vereischt een reeks van chemische bewerkingen. Het is zeer goed denkbaar, dat het molecule van het natieve testishormoon hierdoor constitutiewijzigingen ondergaat met de vorming van testosteron als eindproduct. Volgens deze redeneering zou testosteron dus feitelijk een kunstproduct zijn, en de vraag rijst, of de zich in de legbuistest manifesteerende stof misschien overeenkomt met dit hypothetische, natieve testishormoon. De juistheid dezer veronderstelling is echter twijfelachtig in verband met de relatief groote hoeveelheid, welke van de meeste mannelijke hormonen noodig is, om een positieve legbuisreactie te geven. Een juist duidelijke legbuisreactie wordt pas verkregen met ¼ mgr. testosteron per 750 ccm water, waarvoor niet minder dan 2—3 K.G. testes geëxtraheerd moeten worden. In de bovenvermelde proef werd met slechts 10 gram testisbrij een veel sterkere reactie verkregen, dan ooit met ¼ mgr. van eenig mannelijk hormoon verkregen kan worden. Derhalve is het onwaarschijnlijk dat het met de legbuistest aangetoonde bestanddeel identiek is met de eventueele moederstof van testosteron.

Ad 2. Indien het testosteron als zoodanig in de testikels gevormd wordt, is het waarschijnlijk, dat de productie ervan gelocaliseerd is in het interstitiëele weefsel. Op grond van theoretische overwegingen en ook in verband met onderzoekingen van Martins en Rocha (1931), benevens Rössle (1938), schijnt de afscheiding van een tweede testis-hormoon niet uitgesloten te zijn. De productie ervan zou gelocaliseerd zijn in het kiemepitheel en, in tegenstelling tot testosteron, zou het uitsluitend op de hypophysevoorkwab werken en niet androgeen behoeven te zijn. Of het in de legbuistest werkzame hormoon uit testisbrij identiek is met dit hypothetische hormoon, kan pas op grond van nadere onderzoekingen beoordeeld worden.

Het blijft intusschen een merkwaardig feit, dat een ruw testisextract in de hondenproeven Rössle niet alleen sterker werkt dan de hoeveelheid hierin aanwezig testosteron — ook al houdt men rekening met de versterkende werking der tevens aanwezige co-substanties — doch tevens een grootere werkingsbreedte bezit, m.a.w. beter in staat is het increet van de testikel te vervangen. Op grond hiervan meent Goldberg (1938) dan ook te mogen

aannemen, dat naast testosteron in de testikel nog andere (mannelijke?) hormonen voorkomen, welke tot nu toe nog niet in zuivere vorm verkregen konden worden. Indien de groeikrommen voor deze diverse hormonen voldoende verschillen vertoonen, kan de legbuistest dienen te hunner onderscheiding.

Ad. 3. Chemische onderzoekingen van Hirano c.s. (1936) hebben de aanwezigheid van een progesteron-achtige stof, „testalolon", in varkens-testikels waarschijnlijk gemaakt. Deze stof, die waarschijnlijk een 21-oxy-pregnanol-3-on-20 is, bleek bij het zoogdier onwerkzaam te zijn. Evenals zijn naaste verwanten zal deze stof waarschijnlijk een positieve legbuisreactie kunnen geven. In verband met de groote overeenkomst tusschen de groekrommen verkregen met testisbrij en die welke met verschillende pregnaanverbindingen werden gevonden, bestaat de mogelijkheid, dat de, in de legbuistest werkzame, stof uit testisbrij verwant is aan het 21-oxy-pregnanolon van Hirano, misschien ook hiermee identiek is.

Samenvattend kan dus gezegd worden, dat van de verschillende bestanddeelen, die de testikel produceert, één een legbuisreactie geeft, welke sterk verschilt van die, veroorzaakt door testosteron of eenig ander natuurlijk voorkomend mannelijk of oestrogeen hormoon. De betreffende stof lijkt een pregnaan-derivaat te zijn, en het zou interessant zijn te onderzoeken, of dit bij zoogdieren werkzaam is. Bij pogingen tot isolatie dezer substantie zou de legbuistest als indicator gebruikt kunnen worden.

HOOFDSTUK XVII.

BIJDRAGE TOT DE ENDOCRINOLOGIE VAN DE BIJNIERSCHORS.

De verwijdering van de bijnierschors (practisch worden dan de beide bijnieren in hun geheel verwijderd) leidt tot abnormaal groote vermoeibaarheid der spieren, snel verval van krachten, vermindering van het gehalte aan natrium, chloriden en, naast een verhooging van het kaliumgehalte in het bloed, sterke uitscheiding van keukenzout in de urine, gepaard gaande met waterverlies, stijgen van de reststikstof in het bloed, langzamerhand toenemende storing van de nierfunctie, tenslotte maag- en darmstoornissen, coma en dood. Verdere verschijnselen zijn nog: vermindering van creatine-fosforzuur en vermeerdering van anorganisch fosfaat in de spier, verlaging van het bloedsuikergehalte en van het glycogeengehalte in de lever, stoornissen in de melkzuur-assimilatie en in de vetresorptie door de darm.

Hieruit is af te leiden, dat de bijnierschors één of meer stoffen produceert, welke noodzakelijk zijn voor het in stand houden van het organisme.

Men is erin geslaagd bijnierschors-extracten te bereiden, die in staat zijn bijnierlooze dieren in het leven te houden en in het bijzonder de vermoeibaarheid van de spier en de stoornissen in de stofwisseling te doen verdwijnen.

Het is zeker, dat het werkzame bestanddeel uit de bijnierschors geen eiwit is, doch stikstofvrij en oplosbaar in water en vetoplossende middelen. Het is Reichstein en anderen gelukt uit de bijnierschors een reeks van steroïden te isoleeren. Drie dezer stoffen, corticosteron, dehydro-corticosteron en desoxy-corticosteron, bleken duidelijk bijnierschorswerking te bezitten.

Behalve de stoffen met bijnierschorswerking isoleerde Reichstein in 1936 uit de bijnierschors ook het adrenosteron. Dit

steroïd heeft geen bijnierschorswerking, doch bleek in de kapoenentest werkzaam te zijn.

Tenslotte komen er volgens Callow en Parkes (1936) in de bijnierschors nog hormonen met progesteron-achtige en oestrogene werking voor. Over de chemische natuur dezer stoffen is nog niets met zekerheid bekend.

Op blz. 135 werd reeds medegedeeld, dat het waterige extract uit bijnieren een positieve legbuisreactie veroorzaakt. Ook bijnierschorsextract in de vorm van cortine „Organon" geeft een krachtige legbuisgroei. In verband met het voorkomen van mannelijke en oestrogene, benevens corticosteron- en progesteron-achtige stoffen in de bijnierschors, kan de legbuisreactie zoowel het gevolg zijn van de gecombineerde werkingen van meerdere hormonen, als van de alles overheerschende werking van een enkel hormoon.

Een waterig extract uit bijnieren leverde de volgende groeikrommen:

Een hoeveelheid bijnierweefsel werd met rivierzand fijngewreven, met water geëxtraheerd en gefiltreerd. Het filtraat van 4 gr. versche klierbrij, toegevoegd aan 750 ccm. water, gaf gemiddeld de volgende reacties bij 11 visschen:

TABEL XV

Uren na toediening	Legbuisgroei in A.E.
2	0
4	0,6
6	1,9
8	3,3
10	4,3
12	4,7

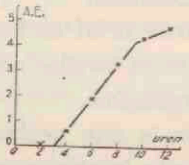


Fig. 93. Groeikromme, verkregen met waterig extract uit bijnieren.

Uit de grafische voorstelling dezer waarden (zie fig. 93) blijkt, dat de groeikromme een latentietijd van 3 uren bezit, terwijl de lineaire groei tot 9½ uur na het begin van de proef doorgaat.

Het is zeer onwaarschijnlijk dat de reactie mede het gevolg is van corticosteron of progesteron, want in dat geval zou de latentietijd 1 uur moeten bedragen.

Of er mannelijke en/of oestrogene stoffen in het spel zijn zou pas bij nader onderzoek kunnen blijken. Indien zij in het extract

aanwezig zijn wordt hun werking in ieder geval sterk overheerscht door die van een of meer steroïden, welke niet identiek zijn met progesteron of corticosteron en ook niet met het werkzame bestanddeel uit cortine, waarvan thans sprake zal zijn.

Met 0,4, 0,5, 0,6, 0,75, 1,3 en 2 ccm van een bepaalde charge Cortine „Organon"*) werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 94).

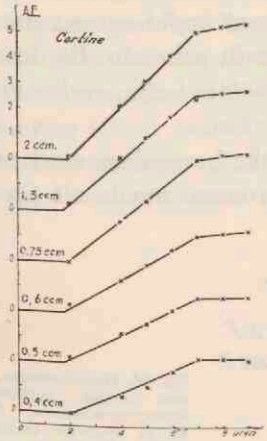


Fig. 94. Groeikromme, verkregen met cortine, „Organon".

De kenmerken dezer groeikrommen zijn:

Latentietijd: 2 uren.

De periode van lineaire groei duurt 5 uren.

De concentratiekromme voor dit cortine-preparaat, (zie fig. 95) is gebaseerd op de in figuur 94 weergegeven groeikrommen en repesenteert de groei, welke na 7 uren is opgetreden.

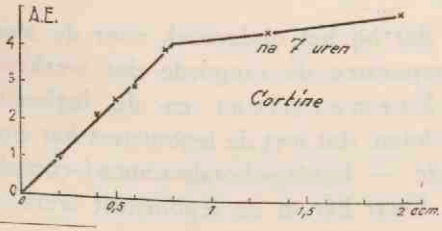


Fig. 95. Concentratiekromme, verkregen met cortine „Organon".

*) 1 ccm cortine „Organon" bevat het extract uit 50 gr. versch bijnierweefsel. De werkzaamheid van verschillende cortine-preparaten kan tot 50 % verschillen.

De kenmerken dezer concentratiekromme zijn:

De knik bij 4,2 A.E.

De daarna optredende lichte stijging.

Het blijkt, dat de groeikrommen, welke met cortine verkregen werden afwijken van die, verkregen met het waterige extract uit bijnierbrij (fig. 93). Bij cortine duurt de latentietijd n.l. 1 uur, en de periode van lineaire groei 1½ uur korter dan bij het ruwe waterige extract. Hierover behoeft men zich niet te verwonderen, omdat cortine bestaat uit een sterk gezuiverd lipoïd-extract dat pas in de eindphase der bereiding in water wordt gebracht. Bij deze zuivering kunnen verschillende steroïden verwijderd zijn, welke een legbuisreactie teweeg brengen.

De groeikromme van cortine wijkt bovendien sterk af van die van desoxycorticosteron en corticosteron, zooals uit fig. 96 blijkt.

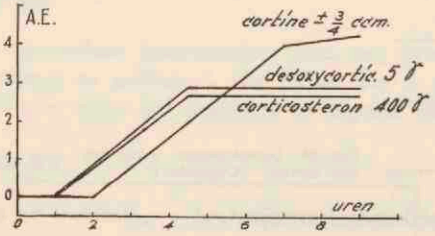


Fig. 96. Groeikrommen, verkregen met cortine, corticosteron en desoxycorticosteron. Men lette op de typische verschillen tusschen die van de eerste en die van de beide laatste substanties.

Het bijnier-extract cortine is therapeutisch belangrijk werkzamer dan overeenkomt met het gehalte aan corticoseron, desoxycorticosteron en verder bekende steroïden met bijnierschorswerking. Vandaar, dat men van oordeel is, dat het eigenlijke werkzame bestanddeel der bijnierschors nog gevonden moet worden.

In verband met het feit, dat bij het onderzoek naar de sterkte van verschillende cortine-preparaten de rangorde der werkzaamheid in de Everse-de Fremery-test en de legbuistest, dezelfde was, is 't niet uitgesloten, dat met de legbuistest het eigenlijke — nog steeds gezochte — bijnierschorshormoon(-complex) direct wordt aangetoond*). Daar het in de legbuistest werkzame

*) Waarbij men voor oogen dient te houden, dat legbuisgroei geen specifieke bijnierschorswerking is.

cortine-bestanddeel een type van groeikromme geeft, dat zich duidelijk onderscheidt van dat der overige onderzochte cortex-steroïden, kan de legbuistest bij pogingen tot isoleering van dit bestanddeel goede diensten bewijzen.

Samenvattend kan dus gezegd worden, dat de bijnierschors een aantal steroïden produceert. Het ruwe, waterige extract uit de bijnier geeft in de legbuistest een andere groeikromme dan cortine. In geen van beide gevallen komt in deze groeikrommen de aanwezigheid van corticosteron of desoxycorticosteron tot uiting. Indien de reactie van cortine in de legbuistest veroorzaakt wordt door het eigenlijke nog steeds gezochte bijnierschorshormoon(-complex), zal deze testmethode bij pogingen tot isolatie van dit bestanddeel wellicht goede diensten kunnen bewijzen.

HOOFDSTUK XVIII.

BIJDRAGE TOT DE ENDOCRINOLOGIE VAN HET OVARIUM.

De vroegtijdige verwijdering der beide eierstokken leidt bij mensch en zoogdier tot uitblijven der met de geslachtsrijpheid gepaard gaande groei- en differentiatieverschijnselen. De verwijdering op latere leeftijd bij de vrouw, tot ophouden der menstruatie en het optreden van stofwisselingsstoornissen. Hieruit is af te leiden, dat het ovarium een of meer stoffen produceert, welke noodzakelijk zijn voor de ontwikkeling en in stand houding van het vrouwelijke geslachtsapparaat en zijn functies.

Uit het follikelvocht werd door Doisy c.s. (1935) het oestradiol geïsoleerd.

Uit het corpus luteum werd door Allen en Corner (1929) het progesteron bereid.

Merkwaardigerwijze schijnt het ovarium ook mannelijk hormoon te produceeren. Uit onderzoekingen van Hill (1937) bleek n.l., dat inplantatie van een stukje ovarium in het oor van een gecastreerde, mannelijke muis in staat was eenige, anders onvoorwaardelijk optredende, castratieverschijnselen op te heffen, hetgeen niet gelukt door injectie van follikelhormoon of progesteron.

Op blz. 135 werd reeds medegedeeld, dat het waterige extract uit ovaria een positieve legbuisreactie kan veroorzaken. In verband met het voorkomen van follikelhormoon, progesteron en mannelijk hormoon in het ovarium, zou de reactie het gevolg kunnen zijn van een of meer dezer hormonen. Uit het volgende zal blijken welke reacties in de legbuistest verkregen werden.

Uit een der ovaria van een drachtige zeug werden de corpora lutea graviditatis zorgvuldig verwijderd. Het overblijvende, 11,8 gr. wegende ovariumweefsel werd met rivierzand fijngewreven, in Na_2SO_4 sicc. opgenomen en met aether geëxtraheerd. Het extract gaf, toegevoegd aan 1½ L. water, bij 6 visschen de volgende gemiddelde legbuisgroei.

TABEL XVI

uren na toediening	legbuisgroei in A.E.
1	0
2	0,3
5½	1,5
10	4

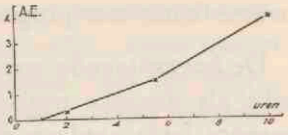


Fig. 97. Groeikromme, verkregen met het lipoïd-extract uit een ovarium van een drachtige zeug.

Hoewel het aantal punten gering is, doet de grafische voorstelling dezer waarden (zie fig. 97) toch vermoeden, dat hier een legbuisgroeikromme is ontstaan, welke kenmerkend is voor de natuurlijk voorkomende, mannelijke hormonen. De kromme zou echter ook verklaard kunnen worden uit de summatie van progesteron en het op blz. 195 nader te noemen luteïdine.

Een proef met een menschelijk ovarium gaf het volgende resultaat:

Patiënte B. d. J., 40 jaar, werd op 21-1-'38 geopereerd wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 7-1-'38. Het linker ovarium woog 5,8 gr. en bevatte een oud corpus luteum. Het rechter ovarium woog 8,9 gr., had een eenigszins vetachtige consistentie en bevatte een corpus rubrum benevens eenige zeer kleine follikels. Het corpus rubrum uit het rechter ovarium werd weggenomen en het follikelvocht quantitatief opgezogen. Het resteerende gedeelte van dit ovarium werd met rivierzand verwreven en op de gebruikelijke wijze verder behandeld. Toegevoegd aan 1½ L. water gaf het extract bij visschen de volgende legbuisgroei:

TABEL XVII

uren na toediening	legbuisgroei in A.E.
2	0,2
4	2,2
5½	3,5

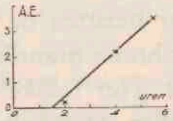


Fig. 98. Groeikromme, verkregen met het lipoïd-extract uit een ovarium van een patiënte met uterus myomatosus.

Uit de grafische voorstelling dezer waarden (zie fig. 98) blijkt, dat de legbuisgroeikromme, met haar latentietijd van bijna 2 uren en na 4½ uren nog lineair voortgezette groei, er geen is van het oestrogene of androgene type. Men krijgt de indruk, dat hier een

progesteron-achtig bestanddeel in het spel is, hetwelk echter niet overeenkomt met progesteron zelf.

De bovenstaande voorbeelden toonen aan, dat zoowel menschelijke als dierlijke ovaria, welke zorgvuldig van rijpe follikels en corpora lutea ontdaan zijn, behalve follikelhormoon nog een ander bestanddeel bevatten, dat geen oestrogeen hormoon is. De omstandigheid, dat dit tot nu toe niet geïdentificeerde bestanddeel met behulp van de legbuistest aangetoond kan worden, is van belang in verband met het volgende :

In het ovarium voltrekt zich een gedeelte der gecompliceerde steroïden-stofwisseling. In tegenstelling tot hetgeen bij testis en bijnierschors het geval is, zijn verschillende stofwisselingscentra in bepaalde deelen van het ovarium gelocaliseerd. De volgende centra kunnen onderscheiden worden :

a) de follikel,
b) het corpus luteum,
c) het interstitiële weefsel.

Ad a) *De follikel.* De wand van de follikel van de Graaf wordt gevormd door de theca interna, welke naar het follikel-lumen toe bekeed is met de membrana granulosa. Onderzoekingen van Zondek hebben bewezen, dat het uitsluitend de theca-cellen zijn, welke het follikelhormoon produceeren en in de liquor folliculi afscheiden. De granulosa zou voornamelijk het corpus luteum-hormoon vormen.

Op blz. 140 is echter aangetoond, dat het vocht uit rijpende en rijpe follikels ook reeds een progesteron-achtig hormoon bevat. Blijkbaar bezitten de granulosa-cellen, zoolang zij in het verband der membrana granulosa liggen, ook reeds een zekere secretorische activiteit. Het follikelvocht bevat dus behalve het secreet van de theca-cellen (follikelhormoon) ook dat der granulosacellen (progesteron-achtig hormoon).

Zondek vond in 1 ccm follikelvocht 0,4—0,5 γ follikelhormoon. Een gelijke hoeveelheid vocht gaf in de legbuistest een reactie, overeenkomend met die van 5—8 γ progesteron.

Ad b) *Het corpus rubrum en corpus luteum.* Onmiddellijk nadat de rijpe follikel onder invloed van de hypophysevoorkwab

barst en zijn inhoud in de vrije buikholte uitstort, vormt zich het corpus rubrum. Dit vormsel bevat een centraal bloedstolsel, omgeven door een wand van granulosa- en theca-cellen, welke binnen 4—5 dagen uitgroeien tot het rijpe corpus luteum. Ook het corpus rubrum bevat naast oestrogene stoffen progesteron-achtig hormoon, zooals op blz. 168 nader aangetoond zal worden.

Van het menschelijke corpus luteum blijven de theca-cellen follikelhormoon produceeren. Het aanzienlijk uitgegroeide granulosa-weefsel produceert thans echter veel meer progesteron of progesteron-achtig hormoon dan in de follikel-phase het geval was. Deze hormoon-productie draagt een temporair karakter in verband met de beperkte levensduur van het corpus luteum. Indien de bevruchting van de uitgestooten eicel achterwege blijft begint het corpus luteum bij de vrouw meestal reeds vanaf de 9de dag na de ovulatie te degenereeren. Bij de intrede der eerstvolgende menstruatie is de progesteron-productie dan zoo goed als geheel opgehouden. Vindt daarentegen bevruchting plaats, dan treedt voorloopig geen degeneratie op en blijft de productie van corpus luteum-hormoon gedurende het eerste deel der graviditeit bestaan.

De, bij corpora lutea verrichte, hormoonbepalingen zullen op blz. 169 e.v. behandeld worden.

Ad c) *De interstitiëele klier.* De moederbodem van het ovarium bestaat uit een bindweefsel-stroma, dat het eigenlijke reparatieve deel van het ovarium vormt. Gedurende de geslachtsrijpheid groeien aan de peripherie steeds weer follikels en corpora lutea uit, welke laatste onder litteekenvorming wederom te gronde gaan.

De vraag, of de interstitiëele theca-cellen een secretorische functie bezitten is lange tijd onderwerp van discussie geweest. Volgens Bouin en Ancel (1902) bestaat het interstitium uit epitheloïde cellen, die zich ontwikkelen uit atretische follikels. Genoemde cellen zouden van bindweefselachtige oorsprong zijn en zich ontwikkelen onder resorptie van een groot aantal primordiale eieren. Volgens Wallart komen de interstitiëele cellen reeds bij pasgeborenen voor en nemen zij tot de puberteit in aantal toe. De sterkste ontwikkeling vindt gedurende de eerste levensjaren plaats. Volgens Aschner zou het interstitiëele weefsel biologisch des te meer door het corpus luteum vervangen worden, naarmate het

zoogdier op een hoogere trap van ontwikkeling staat. Tenslotte is uit de onderzoekingen van Zondek gebleken, dat in de interstitiëele theca-cellen het follikelhormoon geproduceerd wordt.

Uit de bovenvermelde eigen proeven met ovarium-extracten is gebleken, dat het interstitium nog andere steroïden dan het follikelhormoon produceert. Voorloopig is het natuurlijk nog niet mogelijk de aard dezer steroïden langs chemisch-analytische weg vast te stellen. Met behulp van de legbuistest kan dit mengsel van steroïden echter op verschillende wijzen gekenmerkt worden, (n.l. door de duur van de latentie-tijd en de periode van lineaire groei, de vorm der concentratie-kromme enz.), zoodat wijzigingen in de samenstelling van dit mengsel in de legbuisreactie tot uitdrukking kunnen komen.

Dit opent de mogelijkheid tot experimenteel onderzoek met betrekking tot de volgende vragen:

1) Wijzigt zich de samenstelling der door het interstitiëele weefsel geproduceerde steroïden, al naar gelang van de physiologische toestand waarin het ovarium verkeert?

2) Produceert het interstitiëele ovarium-weefsel van een primitiever zoogdier (gedeeltelijk) andere steroïden dan dat van een hooger gedifferentiëerd zoogdier?

Ad 1) Men zou zich namelijk kunnen voorstellen, dat het interstitium voornamelijk folliculine-achtige (grond-)stoffen vormt, zoolang het ovarium zich in de follikelphase bevindt en progesteron-achtige substanties gedurende de corpus luteum-phase. Tijdens de graviditeit vindt, volgens Seitz, opnieuw een sterke ontwikkeling van het interstitiëele ovarium-weefsel plaats. Wellicht houdt dit verband met de verhoogde productie der steroïden, welke voor de ontwikkeling van het embryo noodig zijn. Teleologisch gezien zou het dus zeer wel mogelijk kunnen zijn, dat de steroïden-stofwisseling in het interstitium periodieke wijzigingen ondergaat, in verband met de physiologische evoluties, welke het rijpe ovarium gestadig doormaakt. Omdat deze klier de moederbodem is van de, op rhythmische wijze aan haar peripherie rijpende follikels en corpora lutea, zou dan met recht van een *„interstitiëele klier"* gesproken kunnen worden. Men denke in dit verband ook vooral aan het (post)-

climacterische ovarium, waarin zich geen follikels en corpora lutea meer vormen, zoodat deze centra der steroïd-stofwisseling wegvallen. In dat geval zou de interstitiëele klier wellicht nog een min of meer belangrijke rol te vervullen hebben.

Een moeilijkheid van practische aard, die zich bij dit onderzoek zal voordoen, bestaat hierin, dat een enkel ovarium niet voldoende werkzaam extract levert voor de opstelling van een concentratiekromme. Het zal dus noodig zijn te experimenteeren met meerdere ovaria, waarvan men de zekerheid moet hebben, dat zij zich in dezelfde physiologische toestand bevinden. Men zal dus over veel materiaal moeten kunnen beschikken.

Ad 2) Omdat het interstitiëele weefsel volgens Aschner bij de primitiefste dieren het sterkst ontwikkeld is en de follikel benevens het corpus luteum nog grootendeels functioneel vervangt, zal men juist met ovarium-extracten van lagere zoogdieren goede legbuisreacties kunnen verwachten. Indien de ontogenie ook ten aanzien van het hier behandelde vraagstuk een herhaling van de phylogenie is, leveren de volgende twee opmerkelijke proefresultaten een belangrijke steun aan de zoo juist geopperde mogelijkheid. Het betreft hier de legbuisreactie veroorzaakt door een lipoïd-extract uit eenige praenatale ovaria.

a) De vier ovaria van een, in de 6e zwangerschapsmaand, doodgeboren tweeling, en (afzonderlijk hiervan) de twee uteri, werden op de gebruikelijke wijze geëxtraheerd. De tezamen 0,4 gr. wegende ovaria veroorzaakten bij 6 visschen een gemiddelde legbuisgroei, overeenkomend met die na toediening van 4 γ progesteron, of 10 γ per gram weefsel. (Zie tabel XVIII en fig. 99).
Het lipoïd-extract der uteri gaf daarentegen geen reactie.

TABEL XVIII

uren na toediening	legbuisgroei in A.E.
0	0
2	0,3
4	0,7
5	1,0
6	0,7

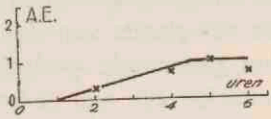


Fig. 99. Groeikromme, verkregen met het lipoïd-extract uit twee praenatale ovaria.

b) De twee ovaria van een voldragen, doodgeboren kindje werden op de gebruikelijke wijze geëxtraheerd. De, tezamen 0,5 gr. wegende ovaria, veroorzaakten een gemiddelde legbuisgroei, overeenkomend met die na toediening van 20 γ progesteron, dus 40 γ per gram weefsel.

Het verloop der groeikromme in fig. 99 toont aan, dat hier een progesteron-achtig hormoon in het spel is. Ook al neemt men aan, dat dit bestanddeel afkomstig was uit het moederlijke lichaam, toch is het hoogst merkwaardig, dat in het praenatale ovarium, onder volkomen afwezigheid van rijpe follikels en corpora lutea, dergelijke groote hoeveelheden hormoon aangetoond konden worden. De concentratie van het progesteron-achtige hormoon, gevonden in de beide ovaria van het oudste foetus is hooger dan die bij rijpe menschelijke corpora lutea!

Deze bevinding is tevens van beteekenis voor de opvatting, die Clauberg huldigt ten aanzien van de rol, welke het onrijpe ovarium speelt bij de intrauterine ontwikkeling van het genitaalapparaat. Volgens hem zijn het voornamelijk de secreten der primordiale follikels, welke voor de grootere doorbloeding en de groei van de zich ontwikkelende uterus verantwoordelijk gesteld moeten worden.

Samenvattend kan dus gezegd worden, dat het ovarium verscheidene steroïden produceert. De follikels en de corpora lutea zijn de hoofdzakelijke producenten van het follikelhormoon en het progesteron, welke beide hormonen o.a. noodzakelijk zijn voor de in stand houding van de uterus. In tegenstelling tot de heerschende opvatting, scheidt de follikel behalve follikelhormoon ook progesteron-achtig hormoon af. Onder uitsluiting van de rijpe follikels en de corpora lutea blijkt het interstitiële ovarium-weefsel behalve follikelhormoon, ook nog andere steroïden (o.a. progesteron-achtig hormoon) te produceeren. Met het oog op het hooge hormoongehalte, dat gevonden werd in de ovaria van eenige foeten, wordt de beteekenis van de interstitiële klier voor de ontwikkeling van het praenatale geslachtsapparaat naar voren gebracht. Het zou mogelijk zijn aan de hand van de legbuistest waardevolle gegevens aangaande de inwendige afscheiding van de, voor onderzoek zoo weinig toegankelijke, interstitiële klier te verzamelen.

HOOFDSTUK XIX.

BIJDRAGE TOT DE ENDOCRINOLOGIE VAN HET CORPUS LUTEUM.

§ 1. INLEIDING.

Ruim 25 jaar geleden toonde Fraenkel aan, dat bij het gravide konijn op de operatieve verwijdering der corpora lutea abortus volgt, indien de operatie in het begin der graviditeit plaats vindt. Hierdoor werd waarschijnlijk gemaakt, dat het corpus luteum een klier met inwendige afscheiding is, welke — althans bij het konijn — tot taak heeft, de zwangerschap te onderhouden. Het definitieve bewijs werd geleverd, toen het gelukte de graviditeit, ondanks het ontbreken van corpora lutea, door injectie van corpus luteum-extract en later ook door progesteron, te doen voortbestaan en normaal te doen eindigen.

Onderzoekingen van Bouin en Ancel (1910) hebben uitgewezen, dat het endometrium van het bevruchte konijn, onder de invloed van het corpus luteum structuurveranderingen ondergaat, welke de innesteling der bevruchte eicellen mogelijk maken. Op deze structuurverandering, n.l. de overgang van de proliferatie- in de secretie-phase, hebben Allen en Corner de naar hen genoemde test voor de bepaling van het corpus luteum-hormoon gebaseerd.

Dierlijke corpora lutea bestaan volgens Zondek bijna geheel uit granulosa-weefsel en produceeren zoo goed als uitsluitend progesteron. Bij menschelijke corpora lutea wordt de granulosa doorwoekerd door de follikelhormoon produceerende theca interna. Vandaar dat het menschelijke corpus luteum behalve corpus luteum-hormoon ook follikelhormoon afscheidt.

Over ontstaan, persistentie en degeneratie van het corpus luteum is in het hoofdstuk betreffende de endocrinologie van het ovarium

reeds het een en ander gezegd. Er werd vermeld, dat zich, ten aanzien van de levensduur van het corpus luteum, de volgende twee mogelijkheden voordoen:

a) Na het barsten van de follikel komt het corpus luteum binnen 4—5 dagen tot rijpheid. Vervolgens bevindt het corpus luteum zich gedurende eenige dagen in het stadium van grootste secretorische activiteit. Indien het bij de follikelbersting vrijgekomen ei niet bevrucht werd, degenereert het corpus luteum binnen enkele weken tot een hard, wit lichaampje, het corpus albicans.

b) Indien het ei wel bevrucht werd, persisteert het rijpe corpus luteum. Dientengevolge blijft de secretorische phase van het endometrium als gunstige omgeving voor de zich vastzettende of ingenestelde eicel, gedurende de geheele graviditeit bestaan. Hoewel de productie van het corpus luteum-hormoon omstreeks de vierde zwangerschapsmaand grootendeels door de placenta wordt overgenomen, voltrekt de definitieve degeneratie van het corpus luteum graviditatis zich pas tegen het einde der zwangerschap.

Wegens het ontbreken van de hiertoe benoodigde methodiek is het tot dusver niet mogelijk geweest gegevens te verzamelen over productie, verbruik en uitscheiding van het progesteron. De oorzaak hiervan is tweeërlei:

a) Voor de konijnentest zijn zulke groote hoeveelheden progesteron noodig, dat het onmogelijk is hiermede het, in de corpora lutea van één mensch of dier aanwezige, of in het bloed circuleerende, progesteron aan te toonen.

b) Ten onrechte heeft men lange tijd gemeend, het progesteron als zoodanig in de urine te kunnen aantreffen.

Het was dus niet mogelijk aan de hand van de konijnentest iets omtrent de localisatie van progesteron of progesteron-achtig hormoon in het organisme te weten te komen.

In 1936 volgde echter de belangrijke ontdekking van Venning en Browne dat het progesteron voor het grootste deel*) in de

*) Volgens een mondelinge mededeeling van Dr. O. Kamm wordt ca. 80 % als pregnaandiol uitgescheiden.

vorm van het bij zoogdieren onwerkzame, pregnaandiol(-glucuronidaat) met de urine wordt uitgescheiden. Met behulp van een door genoemde onderzoekers uitgewerkte gravimetrische methode is het thans mogelijk de pregnaandiol-uitscheiding, als weerspiegeling van de progesteron-productie, te bepalen. Zoodoende is het dus mogelijk geworden een indruk te verkrijgen van de secretorische activiteit van het corpus luteum en de placenta.

Naast de vraag hoeveel pregnaandiol per tijdseenheid wordt uitgescheiden, resp. hoeveel progesteron of progesteron-achtig hormoon door het corpus luteum gevormd wordt, is het van belang te weten hoeveel van dit hormoon zich op een gegeven oogenblik in een corpus luteum of een placenta bevindt.

Alvorens in te gaan op de hormoon-bepalingen welke met behulp van de legbuistest verricht werden, is het goed een overzicht te geven van de wijze waarop de progesteron-bepalingen tot dusver verricht werden.

§ 2. VERSCHILLENDE TESTMETHODEN.

Zoowel voor de qualitatieve als de quantitatieve bepaling van het corpus luteum-hormoon wordt tot nu toe voornamelijk gebruik gemaakt van de testmethode volgens Allen en Corner, benevens die volgens Clauberg.

De test volgens Allen en Corner.

Een geslachtsrijp konijn wordt gedurende de bronst gedekt. De follikels bersten ongeveer 10 uren nadat de coitus heeft plaats gevonden. Ongeveer 6 uren na de copulatie wordt het konijn gecastreerd; er is dan een begin van corpus luteum-vorming. Omdat er na de verwijdering der ovaria geen hormoon meer wordt gevormd, treedt spoedig een atrophie van het endometrium op en 5 dagen na de operatie vertoont het uterusslijmvlies bijna geheel het beeld der sexueele rust. Slechts wanneer het corpus luteum-hormoon, ter vervanging van de geëxtirpeerde ovaria, in voldoende mate wordt toegediend, ontwikkelt zich de genitaal-tractus zoo, alsof de corpora lutea aanwezig waren gebleven. De kleinste hoeveelheid van het, over 5 dagen in gelijke hoeveelheden geïnjiceerde, hormoon-preparaat, die noodig is om op de 6e dag de secretie-phase van het uterusslijmvlies te-voorschijn te roepen, bevat per definitie 1 konijnen-eenheid (= 1 K.E.).

De test volgens Clauberg.

Deze testmethode is een modificatie van die volgens Allen en Corner. In plaats van een gecastreerd konijn wordt een infantiel dier gebruikt. De bronst

wordt bij het praemature konijn kunstmatig tevoorschijn geroepen, door een gedurende 10 dagen voortgezette injectie van follikel-hormoon, in een hoeveelheid van 10 M.E. per dag, waardoor de uterus voor de progesteronwerking gesensibiliseerd wordt. Vervolgens wordt gedurende de daarop volgende 5 dagen, telkens een vijfde gedeelte van het te testen hormoonpreparaat geïnjiceerd. Wanneer hierdoor nu een ontwikkeling van het endometrium optreedt, welke juist overeenkomt met het beeld, dat bij schijnzwangerschap gevonden wordt, bevat het preparaat 1 K.E. Deze eenheid komt overeen met $^1/_2-^2/_3$ der K.E. volgens Allen en Corner.

De testmethoden volgens Knaus, benevens Holtz en Wöllpert, waarbij de aanwezigheid van het corpus luteum-hormoon op indirecte wijze bepaald wordt, zijn weinig in zwang en kunnen gevoegelijk buiten beschouwing blijven.

Twee nadeelen van de test volgens Allen-Corner en die volgens Clauberg bestaan hierin:

a) De hoeveelheid progesteron, die noodig is om bij het konijn een positieve reactie te geven bedraagt ongeveer 1 mgr. Met behulp dezer testmethoden is het dus niet mogelijk kleine hoeveelheden progesteron qualitatief en quantitatief aan te toonen in lichaamsvloeistoffen of weefsels welke slechts kleine hoeveelheden progesteron bevatten.

b) De test duurt niet minder dan 6 dagen voor het gecastreerde en 14 dagen voor het infantiele konijn.

Omdat het bittervoornwijfje specifiek reageert op zeer geringe hoeveelheden progesteron en progesteron-achtige stoffen (zie blz. 76 e.v.) is hiermede tevens de mogelijkheid gegeven, dit vischje te gebruiken voor de bepaling dezer hormonen in verschillende organen en lichaamsvloeistoffen.

Een volle positieve reactie in de test volgens Allen en Corner wordt pas bereikt met 1000 γ progesteron, terwijl de testmarge voor dit hormoon bij de legbuistest tusschen 0 en 9 γ ligt. De legbuistest is ten aanzien van progesteron dus 100 maal zoo gevoelig als de konijnentest.

Ten aanzien van de specificiteit bestaat er tusschen beide methoden echter dit verschil, dat bij het konijn practisch geen enkel ander hormoon dan progesteron een positieve reactie geeft, terwijl in de legbuistest alle progesteron-derivaten min of meer werkzaam zijn. Men dient er dus op bedacht te zijn, dat de legbuisreactie,

veroorzaakt door een corpus luteum-extract, het gevolg zou kunnen zijn van meer bestanddeelen dan het progesteron alleen.

Toch is het mogelijk de reacties der verschillende bestanddeelen tot op zekere hoogte te onderscheiden, zooals uit het volgende moge blijken.

Naast progesteron kunnen in het corpus luteum de volgende steroïden aangetroffen worden:

a) follikelhormoon (voornamelijk oestradiol),

b) het progesteron-derivaat allo-pregnanolon,

c) andere, misschien nog niet nader geïdentificeerde steroïden, waarvan sommige zich in de legbuistest precies zoo als progesteron zouden kunnen gedragen.

Ad a) Op blz. 124 is aangetoond dat het follikelhormoon geen antagonistische of een synergistische werking ten opzichte van progesteron bezit. Daar de legbuisgroei tengevolge van follikelhormoon pas begint nadat de progesteron-reactie ten einde is, biedt de aanwezigheid van follikelhormoon geen enkele moeilijkheid. In tegendeel, men kan nagaan of het progesteron-preparaat follikelhormoon bevatte of niet. Zoo ja, dan verschijnt na beëindiging der progesteron-reactie het oestradiol-effect.

Deze omstandigheid is van groot belang voor de practijk, omdat het bijna steeds in corpus luteum-extracten aanwezige follikelhormoon, de progesteron-reactie in de konijnentest kan onderdrukken. Om zuivere resultaten met de konijnentest te verkrijgen, moeten de extracten dus steeds zooveel mogelijk van follikelhormoon bevrijd worden, hetgeen voor de legbuistest overbodig is.

Ad b) De aanwezigheid van allo-pregnanolon in een kunstmatig mengsel van dit steroïd met progesteron kan zoowel in de hiermede verkregen groeikrommen als in de ijkingskrommen tot uiting komen. Omdat de groei-, doch vooral de ijkingskrommen voor beide steroïden verschillend zijn, levert het mengsel krommen op, welke al naar gelang van de samenstelling van het mengsel meer gelijken op progesteron- of allo-pregnanolon-krommen en waaruit men de quantitatieve verhouding bij benadering zou kunnen be-

palen. Voor beide hormonen bedraagt de latentietijd 1 uur, zoodat deze grootheid geen differentiëel-diagnostische waarde bezit. Dit is echter wel eenigermate het geval met de daarop volgende periode van lineaire groei, welke voor progesteron slechts 3½ uur, voor allo-pregnanolon echter 4 uren duurt.

Het is van belang, dat van allo-pregnanolon bijna tien maal zooveel noodig zou zijn als van progesteron, om een even groote reactie te verkrijgen.

Het knikpunt in de ijkingskromme ligt voor beide hormonen ongeveer even hoog, en bezit dus geen differentiëel-diagnostische beteekenis. Bij progesteron loopt de kromme dan echter onder een hoek van 6° omhoog, terwijl dit traject bij allo-pregnanolon volkomen horizontaal blijft loopen, hetgeen als een typisch kenmerk te beschouwen is.

Bij eenige onderzoekingen verricht met verschillende extracten van een groot aantal varkens-corpora lutea werden, naar de groei- en concentratiekrommen te oordeelen, uitsluitend reacties van het progesteron-type verkregen. In het algemeen is het allo-pregnanolongehalte blijkbaar te laag om een legbuisreactie te geven en zoodoende storend te werken.

Ad c) Zooals op blz. 75 e.v. werd aangetoond, reageeren de onderzochte progesteron-derivaten anders dan het progesteron zelf. Het is waarschijnlijk dat dit ook geldt voor de nog resteerende niet onderzochte progesteron-derivaten. Derhalve zal de aanwezigheid van andere steroïden in het algemeen zoowel in de groei- als in de concentratiekrommen tot uitdrukking moeten komen. Omdat, behoudens enkele uitzonderingen, met corpus luteum-extracten practisch altijd krommen van het progesteron-type werden verkregen, speelt de aanwezigheid van eventueele andere steroïden meestal geen rol. De enkele gevallen, waarbij de aanwezigheid van een storende factor uit de groeikromme blijkt, worden niet verder in de statistiek betrokken.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de legbuistest zijn groote gevoeligheid en snelle afloop op de konijntest vóór heeft, doch ten aanzien van de specificiteit bijzondere aandacht vergt, welke bij de konijnentest practisch overbodig is. Volgens recente onderzoekingen is de specificiteit van de konijnentest echter niet zoo groot

als aanvankelijk gedacht werd. Met pregneninolon, desoxycorticosteron en testosteron-propionaat kunnen bij het konijn n.l. ook progesteron-achtige effecten verkregen worden.

Tenslotte kunnen nog twee verschillen genoemd worden, welke tusschen de legbuistest en de konijnentest bestaan.

1) In de konijntest moet het progesteron-effect beoordeeld worden naar de intensiteit waarin de praegravide veranderingen van het uterusslijmvlies optreden. Daartoe dienen coupes gemaakt te worden door verschillende gedeelten van de uterus. Zondek heeft er echter op gewezen, dat de praegravide veranderingen zich niet altijd gelijkmatig over het geheele endometrium voltrekken en dat, in sommige gevallen, de proliferatiephase naast de secretie-phase voorkomt. Omdat het ondoenlijk is de geheele uterus te microtomiseeren, blijft dus altijd de kans bestaan, dat progesteron-reacties worden beoordeeld, aan weefseldeelen, welke niet volkomen representatief zijn voor de gemiddelde reactie van het geheele endometrium, welke als maatstaf zou moeten gelden. In de legbuistest heeft men echter te maken met de reactie van de geheele legbuis en niet met deelen ervan, zoodat de volledige reactie beoordeeld kan worden.

2) Verder biedt de konijnentest moeilijkheden ten aanzien van de quantiteitsbepaling. Hoewel de praegravide veranderingen duidelijker zijn naarmate een grootere hoeveelheid progesteron wordt gegeven, bestaat er toch geen eenvoudig verband tusschen hormoon-concentratie en endometrium-reactie. McPhail (1934) heeft getracht dit verband vast te leggen, o.a. door de, bij verschillende progesteron-concentraties verkregen, histologische beelden te reproduceeren. Toch blijft de beoordeeling tamelijk subjectief. In de legbuistest is de groei van het oviduct echter eenvoudig in getallen uit te drukken.

Tenslotte kiest men in de konijnentest één enkel moment uit een zich voltrekkend physiologisch proces. In de legbuistest volgt men door opeenvolgende metingen het verloop der geheele reactie. De konijnentest geeft derhalve een statisch en dus onvolledig beeld van

het physiologische proces, de legbuistest geeft een dynamische en meer volledige voorstelling van de reactie.

De verschillen tusschen de konijnentest en de legbuistest zijn in de volgende tabel overzichtelijk samengevat.

TABEL XIX

proefdier:	*gecastreerd of infantiel konijn:*	*vrouwelijk bitter-voorntje:*
wijze van voorbehandeling:	coïtus-ovarectomie, of follikelhormoon-behandeling	sensibilisatie of afstomping
tijd, welke verloopt tusschen progesteron-toediening en optreden der volle reactie :	6 of 14 dagen	4½ uur
aflezing der reactie:	microscopisch, tamelijk subjectief	macroscopisch, weinig subjectief
de reactie treedt op met:	600—1000 γ	2—10 γ
specificiteit van de test:	bijna volkomen	minder volkomen
te gebruiken:	1 tot enkele malen	meerdere malen
tusschen mate van van reactie en hormoondosis bestaat:	een beperkt quantitatief verband	binnen zekere grenzen een lineair verband
de reactie wordt beoordeeld aan de hand van:	een enkele momentopname uit het reactieproces	de volledige afloop van het reactieproces.

§ 3. HET GEHALTE AAN PROGESTERON-ACHTIG HORMOON VAN MENSCHELIJKE EN DIERLIJKE CORPORA LUTEA.

In het volgende zal verslag worden uitgebracht over het hormoongehalte van een aantal onderzochte dierlijke en menschelijke corpora rubra en corpora lutea.

De bereiding der preparaten geschiedde als volgt:

De versche corpora lutea en -rubra van dier en mensch werden — soms nadat ze eerst in aether bewaard waren — met rivierzand fijngewreven, in Na_2SO_4 sicc. opgenomen, zoodat een droog poeder ontstond, dat met een 6 tot 10-voudige hoeveelheid aether gedurende 1 à 2 weken in een flesch bewaard en dikwijls krachtig geschud werd. Vervolgens werd de aether van het poeder gefiltreerd en tot droog ingedampt. Het residu, dat soms vetachig was, werd eerst in propyleen-glycol opgenomen en daarna tot een bepaald volume aangevuld met water. Indien daartoe aanleiding bestond werd het poeder voor de tweede of derde maal geëxtraheerd. Er werd steeds voor gezorgd, het lipoïd-oplosbare deel met zekerheid quantitatief in handen te krijgen. Er ontstonden meestal heldere oplossingen, soms troebele, waarin de deeltjes oogenschijnlijk homogeen gesuspendeerd waren, een enkele maal oplossingen waaruit vetachtige dee'en zich op de glazen wand afzetten. Bij deze laatste preparaten, welke waarschijnlijk meestal afkomstig zijn geweest van degenereerende corpora lutea, was de mogelijkheid niet uitgesloten, dat zich in dit vet hormoon bevond, dat in deze toestand niet op de visschen zou kunnen inwerken. Deze preparaten bleven verder buiten beschouwing.

Van de op bovenstaande wijze bereide preparaten werd vervolgens zooveel aan het aquariumwater toegevoegd als vermoedelijk noodig zou zijn ter verkrijging van een binnen de testmarge liggende legbuisreactie. Bleek een preparaat een buiten dit traject liggende reactie te geven, dan werd de bepaling zoolang met kleinere hoeveelheden herhaald, tot de reactie binnen de testmarge kwam te liggen.

Er werd steeds nagegaan of de corpus luteum-extracten groeikrommen van het progesteron-type veroorzaakten. In het

bevestigende geval werd de grootte der reactie bepaald door vergelijking met de legbuisgroei die tegelijkertijd bij andere gelijkwaardige visschen ten gevolge van een bekende hoeveelheid, b.v. 5 γ progesteron was opgetreden.

Wanneer de aanwezigheid van storende steroïden uit de groeikrommen bleek, werd het betreffende preparaat verder buiten beschouwing gelaten.

A. *Hormoon-bepalingen, verricht bij dierlijke corpora rubra en -lutea.*

1) Het hormoon-gehalte van dierlijke corpora rubra.

Er is reeds opgemerkt, dat progesteron-achtig hormoon tot dusver uitsluitend in corpora lutea, dus niet in follikels en corpora rubra gevonden is. Met de legbuistest is het niet alleen gelukt dit hormoon in follikelvocht aan te toonen, doch ook in corpora rubra. De volgende waarden werden verkregen.

Varken No. 1.

1 ovarium bevatte 5 corpora rubra, tezamen wegend 1,7 gr. De reactie hiervan kwam overeen met die van 13 γ progesteron, of 7,6 γ per gr. weefsel.
De reactie van 1 corpus rubrum van 0,34 gr. kwam derhalve overeen met die van 2,6 γ progesteron.

Varken No. 2.

2 ovaria bevatten 15 corpora rubra, tezamen wegend 9,6 gr. De reactie hiervan kwam overeen met die van 84 γ progesteron, of 8,8 γ per gr. weefsel.
De reactie van 1 corpus rubrum van 0,64 gr. kwam derhalve overeen met die van 5,6 γ progesteron.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de zoojuist gebarsten follikel reeds een niet onbelangrijke hoeveelheid progesteron-achtig hormoon bevat.

2) Het hormoon-gehalte van dierlijke corpora lutea.

Daar het met de konijnentest niet mogelijk is het progesteron-gehalte van één of enkele corpora lutea te bepalen, wordt als gehalte van een enkel corpus luteum tot nu toe steeds de gemiddelde waarde van een groot aantal corpora lutea opgegeven. Deze corpora lutea zullen grootendeels van verschillende leeftijd zijn geweest en derhalve uiteenloopende stadia van ontwikkeling hebben vertegenwoordigd. Om de physiologie van het corpus luteum nader te leeren kennen is het echter van belang het verband op te sporen tusschen leeftijd, gehalte aan progesteron-achtig hormoon en secretorische activiteit. De secretorische activiteit kan eigenlijk alleen gemeten worden aan de hand der pregnaandiol-uitscheiding, waaromtrent bij dieren nog niets bekend is. Daarom zal in het volgende worden volstaan met opgaven omtrent het verband tusschen leeftijd of gewicht van een of enkele corpora lutea en het hierbij gevonden gehalte aan progesteron-achtig hormoon.

a) *Niet-drachtige dieren.*

Volgens Corner bevatten 40 rijpe varkens-corpora lutea, welke tezamen ongeveer 20 gr. wegen, ongeveer 1 mgr. progesteron (= 1 K.E.). Derhalve bevat 1 rijp varkens-corpus luteum, dat ongeveer 0,5 gr. weegt, gemiddeld 25 γ progesteron.

Elden (1934) vond in varkens-corpora lutea van verschillende stadia van ontwikkeling de volgende hoeveelheden progesteron per 1 gr. weefsel:

In jonge corpora lutea tot de 6de en 7de dag na het bersten van de follikel 41 γ.
In geheel rijpe corpora lutea van vroege en halverwege gevorderde zwangerschap 31 γ,
In degenereerende corpora lutea 16 γ,
In corpora albicantia minder dan 2,5 γ.

Volgens Clauberg is progesteron bijna uitsluitend in geheel rijpe corpora lutea aan te toonen. Hij schrijft: „Ja, selbst in Corpora lutea die sich nicht gerade in Blüte befinden, ist Luteohormon entweder gar nicht, oder nur in Spuren zu gewinnen."

In verband met de opgave van E l d e n, dat jonge corpora lutea reeds veel progesteron bevatten, leek het van belang na te gaan, vanaf welk gewicht een corpus luteum aantoonbare hoeveelheden progesteron-achtig hormoon bevat.

Of de gele lichaampjes zich in het stadium van ontwikkeling of degeneratie bevonden, hetgeen histologisch beoordeeld kan worden, werd niet nagegaan, ten einde geen materiaal te verliezen. Onderzocht werden de uit 1 of 2 homologe ovaria afkomstige corpora lutea van 0,06, 0,10, 0,12, 0,18 en 0,24 gr. De resultaten waren als volgt:

Varken No. 1.

1 ovarium bevatte 7 corpora lutea, tezamen wegend 0,4 gr. Het lipoïd-extract hiervan gaf geen reactie.

Varken No. 2.

1 ovarium bevatte 7 corpora lutea, tezamen wegend 0,72 gr. Hiermede werd geen reactie verkregen.

Varken No. 3.

1 ovarium bevatte 9 corpora lutea, tezamen wegend 1,1 gr. Hiermede werd geen reactie verkregen.

Varken No. 4.

2 ovaria bevatten 14 corpora lutea, tezamen wegend 2,52 gr. De reactie hiervan kwam overeen met die van 20 γ progesteron, of 8 γ per gram weefsel. De reactie van 1 corp. lut. van 0,18 gr. kwam derhalve overeen met die van 1,4 γ progesteron.

Varken No. 5.

2 ovaria bevatten 14 corpora lutea, tezamen wegend 3,4 gr. De reactie hiervan kwam overeen met die van 20 γ progesteron, of 6 γ per gram weefsel. De reactie van 1 corp. lut. van 0,24 gr. kwam derhalve overeen met die van 1,4 γ progesteron.

b) *Drachtige dieren.*

Rund No. 1. (dracht van 3½ maand).

1 ovarium bevatte 1 corpus luteum, dat 6,1 gr. woog. De reactie hiervan kwam overeen met die van 167 γ progesteron, of 27 γ per gram weefsel.

B. *Hormoonbepalingen verricht bij menschelijke corpora rubra en -lutea.*

Na de aantooning van progesteron in de corpora lutea van sommige groote huisdieren, heeft het langere tijd geduurd alvorens het Clauberg (1932) en Pratt (1934) gelukte, de aanwezigheid van dit hormoon ook in menschelijke corpora lutea vast te stellen. De oorzaak hiervan is gelegen in het relatief lage progesteron-gehalte dezer klieren. Dat de legbuistest ook hier van dienst kan zijn moge blijken uit de volgende reeks hormoon-bepalingen, bij menschelijke corpora lutea verricht.

De verwijdering van ovaria en corpora lutea bij vrouwen, vindt slechts zelden plaats. Vandaar dat het noodig was het materiaal bij verschillende gynaecologische klinieken aan te vragen, om de kans te hebben er een voldoende aantal in handen te krijgen.

Op verzoek werden de corpora lutea onmiddellijk na de operatie zorgvuldig uit de ovaria geprepareerd en in een fleschje met aether verzonden. De kliertjes ondergaan tijdens hun verblijf in aether geen volume- of gewichtsverandering van beteekenis. Na ontvangst werden zij gewogen en overeenkomstig de voor varkens-corpora lutea gevolgde methode verwerkt.

Het lag in de bedoeling het verband tusschen gewicht, gehalte aan progesteron-achtig hormoon en leeftijd van het corpus luteum te onderzoeken.

Ter berekening van de leeftijd was het noodig de volgende gegevens te kennen:

1) de eerste dag der laatste menstruatie,

2) de dag der operatie,

3) de duur van de cyclus, onder opgave der voorgekomen schommelingen in het aantal dagen.

De onder 1) en 2) genoemde gegevens konden steeds verkregen worden, de onder 3) genoemde echter niet altijd.

Onder cyclus wordt hier verstaan het aantal dagen, dat verloopt tusschen de eerste dag eener menstruatie en de eerste dag der daaropvolgende. Hoewel een cyclus van 28 dagen veelvuldig voorkomt, worden ook dikwijls perioden van 27, 26 . . . of 29, 30 . . . dagen gevonden, hetgeen de ouderdomsbepaling der corpora lutea bemoeilijkt. Bovendien is het aantal dagen van een periode bij een vrouw bijna altijd aan fluctuaties onderhevig. Over het algemeen wordt aangenomen, dat de ovulatie ongeveer in het midden der periode plaats vindt, dus bij een cyclus van 28 dagen, omstreeks de 14e dag na de eerste dag der laatste menstruatie. Volgens Knaus zou de ovulatie steeds 15 dagen voor de volgende menstruatie plaats vinden, ongeacht de duur der periode. Daar de geovuleerde follikel (= corpus rubrum) het jongste stadium in de ontwikkeling van het corpus luteum voorstelt, valt de 14de dag na de eerste dag der laatste menstruatie samen met de 1ste „levensdag" van het corpus luteum. Wanneer het corpus luteum op de eerste dag der volgende periode zijn secretorische activiteit practisch geheel gestaakt heeft, is het dus ongeveer 14 dagen oud. Wordt 22 dagen na het begin der laatste menstruatie, of 8 dagen na de dag der ovulatie een corpus luteum verwijderd, dan was dit dus 8 dagen oud. Soms vindt men in ovaria nog corpora lutea uit de vorige periode. Deze zijn dus steeds ouder dan 14 dagen.

Hieronder volgt de opstelling van een aantal menschelijke corpora lutea, onder opgave van hun gewicht, hun vermoedelijke ouderdom en hun gehalte aan progesteron-achtig hormoon. Voor zoover de duur van de cyclus niet bekend is wordt een periode van 28 dagen aangenomen. Indien de duur van de cyclus bekend is en afwijkt van 28 dagen, wordt tevens de ouderdom aangegeven, welke het corpus luteum gehad zou hebben, indien de cyclus 28 dagen had bedragen.

1.

Patiënte v. B. d. J., 40 jaar, Laparotomie op 21-1-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 7-1-'38. Duur van de cyclus onbekend.

Rechter ovarium bevatte 1 corpus rubrum van 2,2 gr., vermoedelijk 1 dag oud. De reactie kwam overeen met die van 16 γ of 7 γ per gram. Linker ovarium bevatte 1 oud corpus luteum van 0,25 gr., vermoedelijk 28 dagen oud en gaf geen reactie.

2.

Patiënte W., 25 jaar. Laparotomie op 17-2-'38 wegens ovariumcyste. Laatste menstruatie 16-2-'38. Duur van de cyclus 28 dagen. Het cysteuse ovarium bevatte 1 corpus rubrum van 2,1 gr., vermoedelijk 1 dag oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 10 γ progesteron of 5 γ per gram.

3.

Patiënte D., 21 jaar. Sectie. Laatste menstruatie onbekend. Duur van de cyclus onbekend. Een der ovaria bevatte 1 corpus rubrum van 1,25 gr., vermoedelijk 1 dag oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 8 γ progesteron of 6 γ per gram.

4.

Patiënte G. B., 43 jaar. Laparotomie op 5-7-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 21-6-'38. Duur van de cyclus onbekend. Een der geëxtirpeerde ovaria bevatte 1 corpus rubrum van 2,1 gr. vermoedelijk 1 dag oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 28 γ progesteron of 13 γ per gram.

5.

Patiënte R., 42 jaar. Laparotomie op 1-10-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 14-9-'38. Duur van de cyclus 28 dagen. Een der geëxtirpeerde ovaria bevatte 1 corpus rubrum van 0,65 gr., vermoedelijk 3 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 5 γ progesteron, of 8 γ per gram.

6.

Patiënte D., leeftijd onbekend. Laparotomie op 22-9-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie waarschijnlijk 5-9-'38. Duur van de cyclus onbekend. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 2,2 gr., vermoedelijk 3 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 24 γ progesteron, of 11 γ per gram.

7.
Patiënte P., 42 jaar. Laparotomie op 8-7-'38 voor multipele myomen. Laatste menstruatie op 25-6-'38. Duur van de cyclus 24 dagen. Een der geëxtirpeerde ovaria bevatte 1 corpus luteum van 1,1 gr., vermoedelijk 2 dagen oud. Bij een cyclus van 28 dagen, zou dit c. l. ongeveer 4 dagen oud geweest zijn. De reactie hiervan kwam overeen met die van 20 γ progesteron of 18 γ per gram.

8.
Patiënte Z., leeftijd 45 jaar. Ovarectomie wegens uterus myomatosus, op de 19de dag van de cyclus. Duur van de cyclus onbekend. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 2,6 gr., vermoedelijk 5 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 38 γ progesteron, of 15 γ per gram.

9.
Patiënte U. U., 44 jaar. Laparotomie op 17-1-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 26-12-'37. Duur van de cyclus onbekend. Het rechter ovarium bevatte 1 corpus luteum van 0.67 gr., vermoedelijk 8 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 8 γ progesteron of 12 γ per gram.

10.
Patiënte P., 37 jaar. Laparotomie op 23-5-'38 wegens epithelioma cervicis. Laatste menstruatie 1-5-'38. Duur van de cyclus 28 dagen. Een der geëxtirpeerde ovaria bevatte 1 corpus luteum van 1,6 gr., vermoedelijk 8 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 24 γ progesteron of 15 γ per gram.

11.
Patiënte L., 41 jaar. Laparotomie op 21-7-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie van 28-6-'38 tot 12-7-'38. Duur van de cyclus onbekend. Een der geëxtirpeerde ovaria bevatte 1 corpus luteum van 0,9 gr., vermoedelijk 9 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 18 γ progesteron, of 20 γ per gram.

12.
Patiënte B., 40 jaar. Laparotomie op 15-11'38 wegens uterus

myomatosus. Laatste menstruatie 20-10-'38. Duur van de cyclus onbekend. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 1,5 gr., vermoedelijk 12 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 30 γ progesteron of 20 γ per gram.

13.
Patiënte S., 48 jaar. Laparotomie op 31-3-'38, wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 4-3-'38. Duur van de cyclus onbekend. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 2 gr., vermoedelijk 13 dagen oud, waarmede geen reactie verkregen werd.

14.
Patiënte H. K., 38 jaar. Ovarectomie op 17-2-'38. Laatste menstruatie 17-2-'38. Duur van de cyclus onbekend. Linker ovarium bevatte 1 corpus luteum van 1,3 gr., vermoedelijk 14 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 13 γ progesteron of 10 γ per gram.

15.
Patiënte I. W., 46 jaar. Laparotomie op 2-4-'38 wegens teercyste. Laatste menstruatie op 9-3-'38. Duur van de cyclus 3—4 weken. Het cysteuse ovarium bevatte 1 corpus luteum van 1,4 gr., vermoedelijk 12 dagen oud. Bij een cyclus van 28 dagen zou dit c. l. ongeveer 14 dagen oud geweest zijn. De reactie kwam overeen met die van 16 γ progesteron, of 11 γ per gram.

16.
Patiënte v. L., leeftijd onbekend. Laparotomie op 21-10-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie waarschijnlijk op 7-10-'38. Duur van de cyclus onbekend. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 1,8 gr. vermoedelijk 14 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 14 γ progesteron of 8 γ per gram.

17.
Patiënte M., 39 jaar. Laparotomie op 2-4-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 12-3-'38. Duur van de cyclus 3 weken. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van

0,85 gr., vermoedelijk 11 dagen oud. Bij een cyclus van 28 dagen, zou dit c. l. ongeveer 15 dagen oud geweest zijn. De reactie hiervan kwam overeen met die van 5 γ progesteron, of 6 γ per gram.

18.

Patiënte V. R., 50 jaar. Laparotomie op 8-10-'38 wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie van 8-22 Sept. '38 (profuse bloeding). Duur van de cyclus onbekend. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 2,4 gr., hoogstens 16 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 24 γ progesteron, of 10 γ per gram.

19.

Patiënte H. W., 45 jaar. Ovarectomie op 17-11-'38. Laatste menstruatie 19-9-'38. Duur van de cyclus 28 dagen. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 1,3 gr., vermoedelijk 16 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 21 γ progesteron, of 16 γ per gram.

20.

Patiënte A., 30 jaar. Laparotomie op 14-5-'38 wegens vergroeiing als gevolg eener oude adnexitis. Laatste menstruatie 8-5-'38. Duur van de cyclus onbekend. Een der geëxtirpeerde ovaria bevatte 1 corpus luteum van 0,1 gr., vermoedelijk 20 dagen oud, waarmee geen reactie verkregen werd.

21.

Patiënte M. L., 45 jaar. Laparotomie op 20-10-'38, wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie op 14-10-'38. Duur van de cyclus onbekend. Het geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 0,7 gr., vermoedelijk 20 dagen oud, waarmee geen reactie verkregen werd.

22.

Patiënte Z., leeftijd onbekend. Laparotomie op 14-1-'38, wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 5-1-'38. Duur van de cyclus onbekend. Het rechter ovarium bevatte 1 oud corpus luteum van

0,45 gr., vermoedelijk 23 dagen oud, waarmee geen reactie verkregen werd.

23.
Patiënte K., 39 jaar. Hysterectomie op 14-5-'38. Laatste menstruatie 5-5-'38. Duur van de cyclus 21 dagen. Het rechter ovarium bevatte 1 corpus luteum van 0,05 gr., vermoedelijk 20 dagen oud. Bij een cyclus van 28 dagen zou dit c. l. ongeveer 24 dagen oud geweest zijn. Hiermee werd geen reactie verkregen.

24.
Patiënte P., 31 jaar. Ovarectomie op 8-8-'38. Laatste menstruatie 29-7-'38. Duur van de cyclus 28 dagen. Het eene geëxtirpeerde ovarium bevatte 1 corpus luteum van 0,3 gr. vermoedelijk 52 dagen oud, waarmee geen reactie werd verkregen. Het andere ovarium bevatte 1 corpus luteum van 0,6 gr., vermoedelijk 24 dagen oud, waarvan de reactie overeenkwam met die van 3 γ progesteron, of 5 γ per gram.

25.
Patiënte B. H. B., 47 jaar. Laparotomie op 22-2-38, wegens uterus myomatosus. Laatste menstruatie 11-2-'38. Duur van de cyclus 28 dagen. Het linker ovarium bevatte 1 corpus luteum van 0,15 gr., vermoedelijk 25 dagen oud, waarmee geen reactie verkregen werd. Het rechter ovarium bevatte 1 corpus candicans van 0,2 gr., vermoedelijk 53 dagen oud, waarmee eveneens geen reactie verkregen werd.

26.
Zie no. 1 het tweede corpus luteum.

27.
Zie no. 24 het eerste corpus luteum.

28.
Zie no. 25 het tweede corpus luteum.

Rangschikt men deze corpora lutea volgens hun, tot een cyclus van 28 dagen herleide leeftijd, dan ontstaat de volgende tabel:

TABEL XX

No.	Gewicht in gr.	Leeftijd in dagen	De reactie van de geheele klier kwam overeen met die van .... γ progesteron	De reactie van van 1 gr. weefsel kwam overeen met die van .... γ progesteron
1	2,2	1	16	7
2	2,1	1	10	5
3	1,25	1	8	6
4	2,1	1	28	13
5	0,65	3	5	8
6	2,2	3	24	11
7	1,1	2 (4)*)	20	18
8	2,6	5	38	15
9	0,67	8	8	12
10	1,6	8	24	15
11	0,9	9	18	20
12	1,5	12	30	20
13	2	13	0	0
14	1,3	14	13	10
15	1,4	12 (14)	16	11
16	1,8	14	14	8
17	0,85	11 (15)	5	6
18	2,4	16	24	10
19	1,3	16	21	16
20	0,1	20	0	0
21	0,7	20	0	0
22	0,45	23	0	0
23	0,05	20 (24)	0	0
24	0,6	24	3	5
25	0,2	25	0	0
26	0,25	28	0	0
27	0,3	52	0	0
28	0,15	53	0	0

Op grond van de bovenstaande gegevens kan worden nagegaan:

a) Het verband tusschen leeftijd en gewicht.

b) Het verband tusschen leeftijd en gehalte aan progesteronachtig hormoon.

*) De tusschen haakjes geplaatste getallen geven de leeftijd weer na herleiding van de cyclus tot een van 28 dagen.

Ad a) Het verband tusschen leeftijd en gewicht van menschelijke corpora lutea is nog nimmer nagegaan. Daarentegen heeft Corner c.s. (1936) dit verband onderzocht bij corpora lutea van de Rhesus-aap. Hij vond een snelle grootte-toename tusschen de eerste en zesde dag na de (vermoedelijke) ovulatie en vervolgens een, met de degeneratie gepaard gaande, geleidelijke afname in grootte, tot negen weken na de ovulatie. Dat voor menschelijke corpora lutea een soortgelijk verband bestaat, moge uit fig.100 blijken.

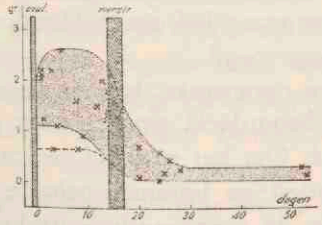


Fig. 100. Deze grafiek geeft het verband weer tusschen gewicht van een aantal menschelijke corpora lutea en hun vermoedelijke leeftijd.

Op grond van hun lage hormoon-gehalte is het niet uitgesloten, dat 2 abnormaal kleine corpora lutea van resp. 3 en 8 dagen oud, als functioneel onvolwaardig beschouwd moeten worden, vooral ook omdat de patiënten waarvan zij afkomstig zijn resp. 42 en 44 jaar oud, dus waarschijnlijk climacterisch waren. Hierdoor kan de onderste begrenzing in de figuur een weinig naar boven verplaatst worden, zoodat het gepuncteerde traject ontstaat.

Uit de figuur blijkt, dat de corpora rubra en -lutea vlak na de ovulatie reeds tamelijk groot zijn en de rijpe corpora lutea hen in grootte slechts weinig overtreffen. Tegen het einde der corpus luteum-phase neemt de grootte af. Tijdens de eerstvolgende menstruatie worden de corpora lutea steeds kleiner en tegen het einde van de volgende cyclus is het laagste gewicht ongeveer bereikt.

Ad b) Het verband tusschen leeftijd en gehalte aan progesteron-achtig hormoon van menschelijke corpora lutea is nog nimmer onderzocht. Op grond van de in tabel XX vermelde gegevens kan dit verband als volgt weergegeven worden (zie fig. 101).

In deze figuur zijn met kruisjes de gevonden gehalten aan progesteron-achtig hormoon per gram, uitgedrukt in $\gamma\gamma$ progesteron,

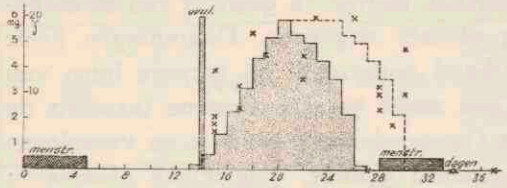


Fig. 101. Deze grafiek vertoont het verband tusschen a) het gehalte aan progesteron-achtig hormoon van een aantal menschelijke corpora lutea, uitgedrukt in $\gamma\gamma$ progesteron en, b) de pregnaandiol-uitscheiding volgens Venning en Browne, op overeenkomstige dagen van de cyclus.

in verband met de leeftijden der onderzochte corpora lutea weergegeven. De bovendien voorhanden pyramide-vormige gepuncteerde figuur representeert de gemiddelde, door Venning en Browne in 1936 bij 9 vrouwen gevonden pregnaandiol-uitscheiding, welke er om de volgende reden aan is toegevoegd.

Zooals reeds op blz. 160 werd opgemerkt, kan de secretorische activiteit van het corpus luteum beoordeeld worden naar de pregnaandiol-uitscheiding in de urine. Om het verband te leeren kennen tusschen secretorische activiteit en hormoon-gehalte van het corpus luteum is het dus noodig, de pregnaandiol-uitscheiding op verschillende dagen van de cyclus te vergelijken met het hormoongehalte van corpora lutea, welke op overeenkomstige dagen verwijderd werden.

De uitscheidingskromme voor pregnaandiol werd geconstrueerd aan de hand van de door Venning en Browne verkregen waarden bij een 9-tal normale vrouwen. Voor iedere vrouw werden deze waarden herleid tot een standaard-cyclus van 28 dagen en vervolgens werd de gemiddelde dagelijksche uitscheiding bepaald. Zoo ontstond de grafische voorstelling van fig. 101 waaruit blijkt, dat de pregnaandiol-uitscheiding, als weerspiegeling der secretorische activiteit van het corpus luteum, vanaf de ovulatie lineair toeneemt tot de zevende levensdag van het corpus luteum. Daarna daalt de uitscheiding, eerst geleidelijk, vervolgens sneller, en is op de eerste dag der volgende menstruatie geheel beëindigd.

Wat nu de kruisjes betreft, welke het hormoon-gehalte der onderzochte corpora lutea weergeven, deze blijken in een zône te liggen, welke ongeveer gelijkvormig is aan de besproken uitscheidingskromme. *Gedurende de eerste 7 dagen, na de ovulatie, dus tijdens de groei van het c.l., blijkt er een duidelijke paralleliteit te bestaan tusschen secretorische activiteit en gehalte aan progesteron-achtig hormoon. Gedurende de volgende 7 dagen, dus tijdens*

de degeneratie van het c.l. blijkt de secretorische activiteit sneller af te nemen dan het hormoon-gehalte.

Dit verschijnsel berust ongetwijfeld op de omstandigheid, dat tijdens de verminderde hormoon-productie, de corpora lutea nog eenige tijd hun normale voorraad vasthouden, totdat de weefsel-degeneratie zoover voortschrijdt, dat ook het hormoon verdwijnt. Men krijgt de indruk, *dat de daling in het hormoon-gehalte ongeveer 4 dagen later inzet, dan de daling der hormoon-productie.* (Zie de vier dagen naar rechts verschoven stippellijn.)

De gevonden hormoon-gehalten bieden gelegenheid nader in te gaan op de vraag of het in de legbuistest werkzame bestanddeel der onderzochte corpora lutea identiek is met progesteron, resp. hoofdzakelijk uit progesteron bestaat, of voor het grootste gedeelte op rekening van andere steroïden gesteld moet worden. In het laatste geval zouden de gevonden reacties dan de som zijn van de reactie op progesteron *plus* die op de overige werkzame componenten. Dan zou de legbuistest over het algemeen hoogere waarden moeten opleveren dan overeenkomt met de, in de corpora lutea aanwezige, hoeveelheid progesteron.

In werkelijkheid werden met de legbuistest per gram weefsel van rijpe menschelijke corpora lutea reacties verkregen, overeenkomend met die van 10—20 γ progesteron.

Clauberg (1932) verkreeg met zijn konijnentest een juist positieve reactie met het extract uit 55 gr. menschelijk corpus luteum-weefsel, hetgeen neerkomt op een progesteron-gehalte van 12—16 γ per gram. Hieruit blijkt, dat de, met de beide methoden gevonden, hormoon-gehalten van resp. 10—20 of 12—16 γ, van dezelfde grootte-orde zijn.

Het is dus zeer waarschijnlijk dat de met de legbuistest verkregen progesteron-achtige groeikrommen uitsluitend aan progesteron toegeschreven moeten worden.

Speciale vermelding verdienen nog de volgende 2 gevallen :

1.

Patiënte A. N., 25 jaar. Amenorrhoe sedert 6 maanden. Corpus luteum persistens. Laparotomie. Het rechter ovarium bleek een groot corpus-luteum te bevatten. Het woog 2,2 gr. en was vermoedelijk

wegens persisentie, ruim 160 dagen oud. De reactie van het klierextract kwam overeen met die van 80 γ progesteron, of 36 γ per gram.

Vergelijkt men deze bevindingen met hetgeen hierboven voor normale corpora lutea vastgesteld kon worden, dan blijkt, dat het gewicht van het 160 dagen oude persisteerende corpus luteum overeenkomt met dat van het rijpe, ongeveer 8 dagen oude, normale corpus luteum. De hormoon-concentratie van het persisteerende corpus luteum is echter bijna 2 maal zoo groot als de hoogste waarde, die bij rijpe, normale corpora lutea gevonden werd! Het zou interessant zijn geweest, indien bij deze patiënte ook de pregnaandiol-uitscheiding onderzocht had kunnen worden. Misschien zou dan blijken, dat in dit geval het verdubbelde gehalte aan progesteron-achtig hormoon gepaard ging met een verdubbelde pregnaandiol-uitscheiding.

2.
Patiënte P., 31 jaar. Gravida. Laatste menstruatie waarschijnlijk 10-11-'37. Laparotomie op 13-2-'38 wegens ovarium-cystoom. Het rechter ovarium werd verwijderd en bevatte behalve het cystoom een corpus luteum graviditatis. Het linker ovarium bevatte geen corpus luteum. Het zwangerschaps-corpus luteum woog 1,3 gr. en was vermoedelijk 70 dagen oud. De reactie ervan kwam overeen met die van 42 γ progesteron of 33 γ per gram.

Vergelijkt men het hier gevonden hormoon-gehalte met dat van rijpe corpora lutea menstruationis dan blijkt, dat het 70 dagen oude corpus luteum graviditatis weliswaar kleiner is, doch een bijna twee maal hooger hormoon-gehalte bezit. Hieruit mag misschien de gevolgtrekking gemaakt worden, dat ook de secretorische activiteit van het zwangerschaps-corpus luteum in de 3e maand der graviditeit twee maal hooger is, dan die van het rijpe corpus luteum menstruationis. Dit zou in overeenstemming zijn met de bevinding van Venning en Browne, dat de pregnaandiol-uitscheiding in de 3e zwangerschapsmaand ongeveer twee maal hooger is, dan de hoogste waarde, welke in de corpus luteum-phase van normaal menstrueerende vrouwen gevonden wordt, en tevens met de van klinische zijde gehuldigde opvatting, dat de placenta pas in het begin van de 4e zwangerschapsmaand als progesteron-producente

begint op te treden, om geleidelijk de functie van het corpus luteum graviditatis over te nemen.

Vergelijkt men echter het hormoon-gehalte van het corpus luteum graviditatis met dat van het zoojuist besproken persisteerende corpus luteum, dan blijkt een bijna volkomen overeenstemming te bestaan. Misschien mag men op grond hiervan de secretorische activiteit van het persisteerende corpus luteum gelijkstellen met die van het corpus luteum graviditatis.

Tenslotte dient nog opgemerkt te worden, dat met de extracten van eenige corpora lutea groeikrommen werden verkregen die, zoowel ten aanzien van de latentietijd als in de duur der periode van lineaire groei, sterk afwijken van de voor progesteron en allo-preg-

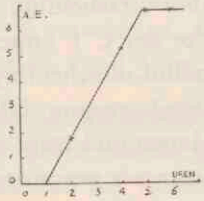


Fig. 102. Groeikromme, verkregen met het lipoid-extract uit een menschelijk corpus luteum. De vorm wijkt af van het progesteron-type.

nanolon geldende krommen (zie fig. 102). (Van deze corpora lutea was het dus niet mogelijk het gehalte aan progesteron-achtig hormoon te bepalen). Dit wijst er op, dat het corpus luteum naast progesteron andere pregnaan-achtige steroïden kan produceeren. Wellicht is het mogelijk met behulp van de legbuistest tot identificatie dezer steroïden te komen.

Samenvattend kan gezegd worden, dat de legbuistest een geschikte methode is voor de aantooning van de hoeveelheid progesteron-achtig hormoon in een enkel corpus luteum. De methode is niet alleen honderd maal gevoeliger dan de tot dusver gebruikelijke konijnentest, doch duurt bovendien slechts 5 uren, terwijl de proefdieren niet gedood behoeven te worden.

In het meerendeel der gevallen bleken de lipoïd-extracten van corpora lutea groeikrommen van het progesteron-type te geven. Tevens kon waarschijnlijk gemaakt worden, dat het in de legbuis

werkzame progesteron-achtige hormoon uit corpora lutea overeenkomt met progesteron.

Op grond van een groot aantal hormoon-bepalingen, verricht bij corpora rubra en lutea van dierlijke en menschelijke oorsprong, kon het volgende resultaat vastgesteld worden:

De zoojuist gebarsten follikel bevat een aantoonbare hoeveelheid progesteron-achtig hormoon.

Ook in kleine, niet rijpe corpora lutea komt het voor.

Het gehalte aan progesteron-achtig hormoon van menschelijke corpora lutea houdt verband met hun secretorische activiteit, beoordeeld naar de uitscheidingskromme voor pregnaandiol, welke ontleend werden aan de onderzoekingen van Venning en Browne.

De stijging van het hormoon-gehalte der corpora lutea gaat gepaard met een verhoogde pregnaandiol-uitscheiding; daarentegen treedt de daling in het hormoon-gehalte der c. l. ongeveer 4 dagen later op, dan de daling in de pregnaandiol-uitscheiding.

In een 160 dagen oud persisteerend corpus luteum en een zwangerschaps-corpus luteum van 70 dagen oud werd een opvallend hoog gehalte aan progesteron-achtig hormoon gevonden.

In enkele gevallen leverde het extract van een corpus luteum groeikrommen op, welke niet tot het progesteron-type behooren. In deze gevallen treedt een (waarschijnlijk pregnaan-achtig bestanddeel) als storende component op. Bij pogingen tot identificatie dezer onbekende substantie(s) zou de legbuistest wellicht goede diensten kunnen bewijzen.

HOOFDSTUK XX.

BIJDRAGE TOT DE ENDOCRINOLOGIE VAN DE PLACENTA.

Dat de placenta beschouwd dient te worden als een klier met inwendige secretie kan niet op de gebruikelijke wijze, namelijk door wegneming van het orgaan en bestudeering der uitvalsverschijselen, bewezen worden. Op grond van klinische en physiologische waarnemingen lag het vermoeden, dat de placenta hormonen afscheidt, echter zeer voor de hand (H a l b a n, 1905).

De vermeerderde uitscheiding van gonadotroop hormoon in de urine, de sterke groei van de gravide uterus welke, zooals bekend is, onder invloed van het follikelhormoon paats vindt, benevens de voortdurende en wellicht stijgende progesteron-behoefte ter instandhouding der graviditeit, deden de vraag naar de localisatie dezer verhoogde hormoon-productie opkomen. Omdat het ovarium tijdens zwangerschap geen ingrijpende wijzingingen ondergaat, welke op een verhoogde hormoon-productie zouden kunnen wijzen, lag het voor de hand de placenta, die reeds in zoovele behoeften van het embryo voorziet, ook hiervoor aansprakelijk te stellen.

Toen het inderdaad gelukte uit placenta-weefsel extracten met hypophysevoorkwab-, folliculine- en progesteron-achtige werkingen te bereiden, heeft men nog eenige tijd gemeend, dat de plancenta de betreffende hormonen niet zelf produceerde, doch tot stapelplaats der elders afgescheiden stoffen diende. Op grond van de volgende proeven is echter komen vast te staan, dat de placenta werkelijk zelf als hormoonproducente optreedt:

1) Uit proeven van G e y c.s. (1938) is gebleken, dat in een cultuur van placenta-weefsel gonadotroop hormoon wordt gevormd.

2) Dubbelzijdige ovarectomie tijdens zwangerschap heeft op het folliculine-gehalte der placenta geen invloed.
3) Uit een onderzoek van Jones en Weil (1938) blijkt, dat na wegneming van het corpus luteum graviditatis, de pregnaandiol-uitscheiding blijft bestaan.

Behalve de genoemde hormonen schijnt de placenta ook kamgroeistoffen te produceeren.

Op blz. 135 werd reeds medegedeeld, dat het waterige extract uit placenta-poeder een positieve legbuisreactie kan geven. In verband met het voorkomen van follikelhormoon, progesteron en mannelijk hormoon in de placenta, zou de reactie het gevolg kunnen zijn van een of meer dezer hormonen. Uit het volgende zal blijken aan welk bestanddeel de in de legbuistest verkregen reacties zijn toe te schrijven.

190 gr. chorionpoeder*), afkomstig van een aantal plancentae, van uitsluitend mannelijke vruchten, werd met aether geëxtraheerd. Na filtratie werd het aetherdeel ingedampt, het residu in propyleen-glycol opgenomen en met water verdund zoodat 1 ccm = extract van 2 gr. poeder.

Met 0,5, 0,8, 1,0, 1,5 en 3,0 ccm van dit extract werden de in fig. 103 weergegeven groeikrommen verkregen.

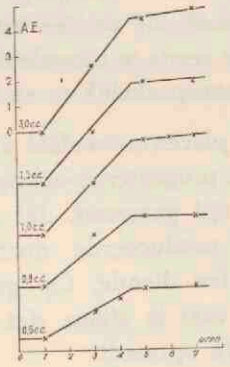


Fig. 103. Groeikromme, verkregen met het lipoïd-extract uit placentapoeder.

*) Dit preparaat werd bereid door Dr. J. Blomberg, die tevens voor het verzamelen der bij mannelijke vruchten behoorende placentae heeft laten zorgdragen.

Het blijkt, dat de groeikrommen van het progesteron-type zijn (vgl. bl. 76). De aanwezigheid van oestrogeen en androgeen hormoon blijkt dus niet storend te werken. Construeert men op grond dezer groeikrommen de concentratie-kromme (zie fig. 104), dan

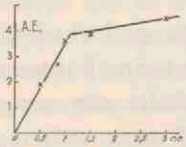


Fig. 104. Concentratiekromme, verkregen met een lipoïd-extract uit placentapoeder.

blijkt ook deze volkomen overeen te stemmen met de ijkingskromme voor progesteron, hetgeen belangwekkend is in verband met het volgende.

Extracten, welke corpus luteum-hormoon bevatten, gedragen zich in chemisch opzicht niet altijd volkomen gelijk aan oplossingen van het chemisch zuivere progesteron, (H o h l w e g, 1939). De eerste zijn gevoelig voor alcaliën, de tweede gedragen zich hiertegenover tamelijk indifferent. Hierdoor is de vraag gerezen, of het progesteron wel identiek is met het progesteron-achtige bestanddeel uit corpus luteum-hormoon bevattende extracten. Mocht het gelukken progesteron uit de placenta te bereiden, dan zou dit nog niets behoeven te bewijzen, want het zou kunnen zijn, dat tijdens de chemische procedure structuurveranderingen in het molecuul van het eigenlijke progesteron-achtige placenta-hormoon optreden, waardoor de twijfel of dit hormoon identiek is met progesteron blijft bestaan.

Omdat gebleken is, dat de tot dusver onderzochte steroïden zich in de legbuistest alle min of meer verschillend gedragen, mag men met eenig recht verwachten, dat een eventueel verschil in chemische structuur tusschen het eigenlijke corpus luteum-hormoon en progesteron ook in de legbuistest tot uiting komt. Het feit echter, dat er een volkomen overeenstemming tusschen de groei- en concentratiekrommen der beide substanties gevonden werd, zou als aanwijzing voor de identiteit van het progesteron-achtige placenta-hormoon beschouwd kunnen worden.

Uit fig. 104 blijkt tevens, dat de met 1,1 ccm placenta-extract verkregen reactie overeenkomt met de werking van 10 γ progesteron. De reactie van 1,1 ccm extract, of 2,2 gr. gedroogd chorionpoeder,

kwam dus overeen met die van 10 γ progesteron, of $4\frac{1}{2}$ γ per gram weefsel. Rekent men dat een placenta gemiddeld 500 gr. weegt en voor 80 % uit water bestaat, dan blijkt dat een placenta die bij een mannelijke vrucht behoort een reactie geeft, overeenkomende me die van ongeveer 450 γ progesteron.

Met betrekking tot de vraag, of de geslachtsbepaling van het embryo in verband staat met het intrauterine hormonale milieu leek het interessant na te gaan, of het gehalte aan progesteron-achtig hormoon van de placenta variëert al naar gelang deze bij een mannelijk of een vrouwelijke vrucht behoorde. Om dit na te gaan werd het hormoon-gehalte bepaald van placentae van vrouwelijke vruchten.

Op geheel overeenkomstige wijze als voor jongens-placentae geschiedde, werd uit placentae van vrouwelijke vruchten een lipoïdextract bereid. De reactie van een uit 500 gr. plancenta afkomstig extract kwam overeen met die van 460 γ progesteron. *Hieruit blijkt, dat de gemiddelde reactie van 1 gram der onderzochte placentae ongeveer overeenkomt met die van 1 γ progesteron, onverschillig of de placenta van een mannelijke of een vrouwelijke vrucht afkomstig was.*

Ook het lipoïd-extract uit een versche placenta gaf een even groote reactie :

> Een 425 gr. wegende versche placenta van een vrouwelijke vrucht werd met rivierzand fijngewreven en in een 6-voudige hoeveelheid Na_2SO_4 sicc. opgenomen. Het zoo ontstane droge poeder werd met aether geëxtraheerd. De reactie van dit extract kwam overeen met die van 440 γ progesteron, of ongeveer 1 γ per gram.

Vergelijkt men de met de legbuistest gevonden gehalten aan progesteron-achtig hormoon met de in de literatuur opgegeven progesteron-gehalten, dan blijkt het volgende.

Het gelukte Allen en Corner, Clauberg, Fels aanvankelijk niet in het lipoïd-extract van één placenta progesteron aan te toonen. Dit is begrijpelijk omdat de hoeveelheid progesteron in één placenta minder dan 1 K.E. volgens Corner bedraagt, terwijl het in de extracten tevens aanwezige follikelhormoon het progesteron-effect bovendien nog onderdrukt. Pas met folliculine-vrije placenta-extracten gelukte het later een juist positieve reactie in de konijnen-

test volgens Clauberg te verkrijgen. In het algemeen blijkt het progesteron-gehalte eener placenta dus maar juist voldoende te zijn voor een positieve uitslag in de Clauberg-test, die met 600—800 γ progesteron de volle reactie geeft. De met de legbuistest verkregen reacties, overeenkomend met die van ongeveer 450 γ progesteron per placenta, zouden dus de doorsnee-waarden van het progesteron-gehalte van placentae kunnen voorstellen.

Tenslotte zij nog het hormoon-gehalte vermeld van de 480 gr. wegende voldragen placenta eener patiënte, bij wie in de 3e zwangerschapsmaand het corpus luteum graviditatis werd weggenomen (zie pat. No. 2 op bl. 182). Vanaf de operatie tot de 6e zwangerschapsmaand werd bij wijze van substitutie-therapie progesteron geïnjiceerd. Daarna niet meer. Indien de placenta uitsluitend tot stapelplaats diende van het door het corpus luteum graviditatis geproduceerde progesteron, zou dit depot gedurende de laatste 3 zwangerschapsmaanden zoo niet geheel, dan toch grootendeels uitgeput moeten zijn. Deze placenta zou dan geen, of abnormaal weinig progesteron moeten bevatten.

Het extract dezer placenta werd op dezelfde wijze als de voorafgaande bewerkt en bleek een reactie te geven, welke overeen kwam met die van 640 γ progesteron, of 1,3 γ per gram. Dit hormoongehalte ligt boven de gevonden gemiddelde waarde van 1 γ per gram en ondersteunt derhalve de opvatting, dat de placenta zelf progesteron-achtig hormoon produceert.

De vraag, of dierlijke plancentae progesteron bevatten, resp. produceeren, is nog onvoldoende onderzocht. Met de placenta van een varken werd het volgende gevonden :

1 placenta, behoorend bij één der 8 foeten, woog 203 gr. De reactie hiervan kwam overeen met die van 20 γ progesteron, of 0,1 γ per gram weefsel.

Blijkbaar bevat de placenta van het varken progesteron-achtig hormoon, doch in een zoo geringe hoeveelheid, dat betwijfeld kan worden of dit orgaan als producent van het hormoon in aanmerking komt, dan wel tot stapelplaats dient.

Het verschil in hormoon-gehalte zou misschien terug te voeren zijn op de omstandigheid, dat bij de mensch een haemochoriale placenta voorkomt, bij de zeug daarentegen een epitheliochoriale.

Het zou interessant zijn het hormoon-gehalte der placenta door de geheele dierenreeks te onderzoeken, dus ook dat van de syndesmochoriale en endotheliochoriale placenta, alsmede de placenta-achtige organen, die bij sommige koudbloedige dieren gevonden worden.

Samenvattend kan dus gezegd worden, dat van alle soorten hormoon, welke de placenta produceert, alleen de reactie van de progesteron-achtige component in de legbuistest tot uiting komt, wanneer van het lipoïd-extract gebruik wordt gemaakt.

Omdat met een dergelijk placenta-extract een concentratiekromme geconstrueerd kan worden, welke volkomen samenvalt met de ijkingskromme voor progesteron, is het waarschijnlijk, dat het door de plancenta geproduceerde en met de legbuistest aangetoonde progesteron-achtige hormoon identiek is met progesteron.

Placentae van mannelijke vruchten bevatten gemiddeld evenveel progesteron-achtig hormoon als die van vrouwelijke.

Als gemiddeld hormoon-gehalte werd gevonden een hoeveelheid waarvan de reactie overeenkomt met die van 1 γ progesteron per gram weefsel, of ongeveer 450 γ per placenta.

De voldragen placenta, afkomstig van een vrouw bij wie het corpus luteum graviditatis in de 3e zwangerschapsmaand was weggenomen, bleek een eenigszins verhoogd gehalte aan progesteron-achtig hormoon te beziten. De placenta dient dus niet als stapelplaats van elders afgescheiden corpus luteum-hormoon, doch produceert dit hormoon zelf.

In een varkensplacenta werd slechts zeer weinig progesteron-achtig hormoon gevonden, hetgeen wellicht toe te schrijven is aan de omstandigheid, dat de zeug geen haemochoriale doch een epitheliochoriale placenta bezit.

HOOFDSTUK XXI.

BIJDRAGE TOT DE ENDOCRINOLOGIE VAN DE MENSCH.

§ 1. EEN NIEUW HORMOON(-DERIVAAT).

In urine van vrouwen heeft men zoowel oestrogene, progesteronachtige als mannelijk werkende stoffen gevonden. Het is zeer waarschijnlijk, dat er in urine nog tal van steroïden voorkomen, welke bij warmbloedige dieren onwerkzaam zijn, of waarvan de werkzaamheid pas duidelijk wordt, wanneer zij bevrijd van werkzame nevenbestanddeelen toegediend worden.

In hoofdstuk II is herhaalde malen sprake geweest van een werkzaam bestanddeel uit urine. In het volgende zal aan de hand van de legbuistest nagegaan worden van welke aard deze stof vermoedelijk is.

Groeikrommen, verkregen met urine.

Met concentraties van ¼, ½, 1, 2, 3 en 5 ccm urine van een niet-zwangere vrouw, werden de volgende groeikrommen verkregen (zie fig. 105).

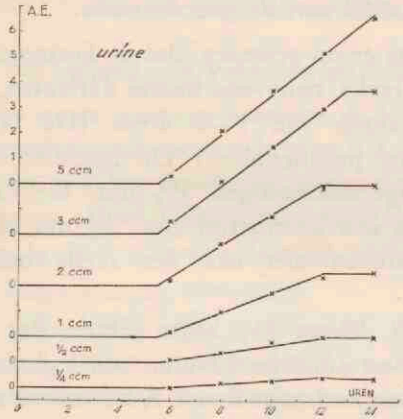


Fig. 105. Groeikrommen, verkregen met urine van een niet-zwangere vrouw. De latentietijd bedraagt 5½ uur.

De kenmerken dezer groeikrommen zijn :

Latentietijd: 5½ uur.
De groei eindigt na 14 uren.

Concentratiekromme, verkregen met urine.

De ~~ijkings~~ concentratiekromme (fig. 106) is gebaseerd op de in fig. 105 weergegeven groeikrommen en representeert de legbuisgroei bij de onderzochte concentraties na 12 uren.

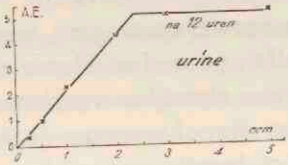


Fig. 106. Concentratiekromme, verkregen 12 uren na toediening van urine eener niet-zwangere vrouw.

De kenmerken dezer concentratiekromme zijn :

Het knikpunt bij 5,1 A.E.
Het hierna optredende horizontale verloop.

Neemt men voorloopig aan, dat het werkzame bestanddeel uit urine, uit niet meer dan één component bestaat, dan wordt men er op grond van de volgende overwegingen toe gedwongen aan te nemen, dat hier een nieuw, niet eerder waargenomen hormoon (-derivaat) in het spel is.

a) Karakteriseering door middel van de groeikromme.

In hoofdstuk IV (fig. 25) is er op gewezen, dat de hormonen uit de pregnaan- en androstaan-reeks, benevens hunne derivaten, vrijwel alle een latentietijd bezitten van 1—2 uren. (De langste latentietijd bedraagt 2½ uur: pregnenolon.) De latentietijd der oestrogene hormonen bedraagt daarentegen 5½ uur. De nieuwe substantie uit urine bezit ook een latentietijd van 5½ uur en zou derhalve overeen kunnen komen met een der reeds bekende oestrogene hormonen.

Uit hoofdstuk XI (fig. 79, 80 en 81) blijkt echter, dat noch oestron, noch oestriol, noch oestradiol na 12 uren een legbuisgroei kunnen veroorzaken welke meer bedraagt dan 1 A.E., ook al neemt

men zeer hooge concentraties, welke nooit in de maximaal gebruikte hoeveelheid urine kunnen voorkomen. De genoemde hormonen geven bovendien reacties, welke 48—60 uren duren, terwijl het urine-bestanddeel niet langer dan 14 uren werkt. Op grond van deze diepgaande verschillen, is het onmogelijk de onbekende substantie uit vrouwen-urine gelijk te stellen met de hierin voorkomende hormonen, oestron, oestriol of oestradiol. Figuur 107 illustreert het verschil tusschen de steilste groeikrommen, welke verkregen konden worden met progesteron, androsteron, oestron en het nieuwe bestanddeel (luteïdine) ten overvloede.

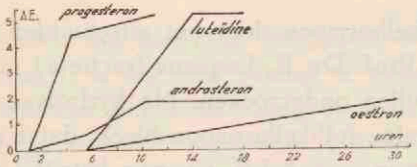


Fig. 107. Groeikrommen, verkregen met relatief groote hoeveelheden progesteron, androsteron, luteïdine en oestron. Men lette op de typische verschillen in latentietijd en duur van het traject van lineaire groei.

Het met de legbuistest aantoonbare bestanddeel uit urine moet derhalve opgevat worden als een nieuw bestanddeel.

b) Karakteriseering door middel van de concentratiekromme.

Met geen der in hoofdstuk VIII, IX, X en XI weergegeven groeikrommen is het mogelijk, onder inachtneming van de werkingsduur, een ijkingskromme te verkrijgen, die identiek is met de concentratiekromme voor het werkzame bestanddeel uit urine.

Ook dit is een belangrijke steun voor de opvatting, dat de werkzame stof uit urine een nieuw hormoon(-derivaat) voorstelt.

c) De invloed van koken en uitschudden met aether.

Om na te gaan, in hoeverre de legbuisreactie na toediening van urine uitsluitend toe te schrijven is aan het nieuwe bestanddeel (III) en niet aan het bovendien aanwezige hypophysevoorkwab-achtige hormoon (I) of follikelhormoon (II), werd een portie zwangeren-urine in de 4 volgende fracties verdeeld:

a) natieve urine, bevattend: I + II + III
b) gekookte*) urine, bevattend: II + III (?)
c) met aether uitgeschudde**) urine, bevattend: I + III (?)
d) met aether uitgeschudde en gekookte urine, bevattend: III (?)

Zie voor *) en **) bladzijde 194 onderaan.

De vier fracties werden vervolgens getest (3 ccm per 750 ccm water) en leverden 12 uren na toediening het volgende resultaat op:

a)	5 A.E.
b)	4,5 A.E.
c)	4,5 A.E.
d)	4,6 A.E.

Blijkbaar wordt de werkzaamheid der urine door koken en door uitschudden met aether slechts weinig beïnvloed.

Om te weten hoeveel follikelhormoon door het uitschudden met aether verwijderd was, heeft Prof. Dr. E. Laqueur fractie a) en d) op follikelhormoon-gehalte willen onderzoeken. Na hydrolyse van het in gebonden vorm aanwezige follikelhormoon bleek, dat fractie a) 80 I.E.***) en fractie d) nog geen 8 I.E. per ccm bevatte, zoodat er dus 90 % follikelhormoon was uitgeschud. Bij het testen van fractie d) mocht een reactie op $3 \times 0{,}8\ \gamma = 2{,}4\ \gamma$ follikelhormoon verwacht worden. Volgens de ijkingskrommen (blz. 118 en 119) voor resp. oestron, oestradiol en oestriol is deze reactie na 12 uren practisch niet waarneembaar. Er was dus voldoende follikelhormoon verwijderd om fractie d) als practisch vrij van follikelhormoon te mogen beschouwen. Fractie a) bevatte per 3 ccm 24 γ follikelhormoon, waarvan een reactie van ongeveer 0,5 A.E. verwacht mocht worden.

d) Over de natuur van het nieuwe bestanddeel.

Uit onderzoekingen van L. H. Bretschneider is gebleken, dat de nieuwe substantie uit urine, evenals de onderzochte steroïden, via de hypophyse-voorkwab werkt en een sterke luteïnisatie van het ovarium bewerkstelligt. Hieruit zou men kunnen afleiden, dat het bewuste bestanddeel eveneens een steroïd is en geen gonadotroop

*) Door koken wordt het gonadotrope hormoon vernietigd.

**) Door uitschudden met aether wordt het follikelhormoon met verschillende andere steroïden verwijderd.

***) 1 I. E. follikelhormoon = 0.1 γ.

hormoon*). Op grond van het intensieve luteïniseeringsvermogen ten aanzien van het bittervoorn-ovarium, wordt voorgesteld de substantie luteïdine te noemen, totdat een, van de chemische constitutie rekenschap gevende, naam bepaald kan worden.**)

Dat het luteïdine geen gonadotroop hormoon is, blijkt ook uit het feit, dat het door koken in sterk zuur of basisch milieu niet aan werkzaamheid inboet, terwijl gonadotroop hormoon hierdoor vernietigd wordt.

Of het luteïdine als moleculair complex gebonden is blijft voorloopig een open vraag. Bij behandeling met verschillende oplosmiddelen, gedraagt de stof zich als een enkelvoudig bestanddeel.

Indien het luteïdine inderdaad een nieuw hormoon (-derivaat) voorstelt, is het van belang te onderzoeken, of het zich ook op grond van zijn uitscheiding door de mensch onderscheidt van de overige bekende steroïden. Uit didactische overwegingen dient echter eerst nagegaan te worden, of de legbuistest doeltreffend is als zwangerschapsreactie.

§ 2. IS DE LEGBUISTEST TE GEBRUIKEN VOOR DE DIAGNOSE VAN ZWANGERSCHAP?

1) Inleiding.

Het optreden eener amenorrhoe bij een overigens normale vrouw doet aan de mogelijke aanwezigheid van een jonge graviditeit denken.

Uit medische gronden is dikwijls spoedig uitsluitsel gewenscht omtrent de oorsprong dezer amenorrhoe. Deze wensch heeft vele pogingen in het werk doen stellen om tot een betrouwbare en weinig omslachtige zwangerschapsreactie te komen.

Men kan onderscheid maken tusschen physische, chemische en biologische zwangerschapsreacties. De physische en chemische methoden zijn tengevolge van onvoldoende documentatie of be-

*) In 1937 heeft schrijver dezes verondersteld, dat de substantie een gonadotrope stof zou zijn. Verdere onderzoekingen hebben echter aangetoond, dat de gonadotrope werking op indirecte wijze tot stand komt, zoodat de vroeger gehuldigde opvatting dient prijsgegeven te worden.

**) Dr. Ir. A. Ph. Weber heeft mij erop attent gemaakt, dat de aanvankelijk gebezigde naam lutidine reeds dient ter aanduiding der dimethylpyridinen. Vandaar dat beter het woord luteïdine gebruikt kan worden.

trouwbaarheid niet gebruikelijk. Van de biologische methoden heeft de reactie volgens Aschheim en Zondek algemeen ingang gevonden. Deze reactie berust op het aantoonen van een verhoogde concentratie van gonadotroop hormoon in de urine der gravide vrouw, welk hormoon in de urine van niet-zwangere vrouwen, niet of slechts in zeer geringe hoeveelheden aantoonbaar is. De proef wordt uitgevoerd met behulp van infantiele muizen, wier aanvankelijk onontwikkelde ovaria op de injectie van zwangeren-urine reageeren met de vorming van bloeduitstortingen in de follikels. De reactie vergt 2½—3½ dag. Een positieve reactie volgens Aschheim en Zondek wordt bij normale graviditeit gevonden in 98 % der gevallen; een negatieve reactie sluit zwangerschap met een zekerheid van 99,5 % uit. Een grootere mate van betrouwbaarheid kan men van een biologische test-methode nauwelijks verlangen.

Hoewel Friedman in plaats van de infantiele muis het volwassen vrouwelijk konijn als testobject heeft ingevoerd, waardoor een positieve reactie reeds na 24 uur kan worden vastgesteld, blijft de behoefte bestaan aan een zwangerschapsreactie, die een nog vluggere en toch betrouwbare beoordeeling van het resultaat toelaat.

Zooals reeds eerder is medegedeeld, verscheen in 1934 van de hand van Kanter, Bauer en Klawans een publicatie, getiteld „A new biologic test for hormones in pregnancy", waardoor de verwachting werd gewekt, dat men met behulp van het vrouwelijke bittervoorntje als testobject zwangerschap uit de urine zou kunnen diagnostiseeren. Kanter c.s. constateerde namelijk dat, na toevoeging van een weinig zwangeren-urine aan het aquariumwater, van de urine van 31 vrouwen, die een positieve reactie volgens Friedman vertoonde, de urine van 27 vrouwen tevens een opmerkelijke legbuisverlenging tengevolge had.

Op grond hiervan meende Kanter c.s. een test gevonden te hebben, waarmede een tijdens zwangerschap in overmaat aanwezige oestrogene substantie kon worden aangetoond, met behulp waarvan een eventueel voorhanden zijnde graviditeit kon worden vastgesteld. Verder was hij van meening, dat de legbuistest van groote klinische waarde zou blijken te zijn, met groote voordeelen boven de reactie volgens Aschheim en Zondek en die volgens Friedman.

Inmiddels werd echter in 1933 reeds door Ehrhardt en Kühn vastgesteld, dat urine van niet-zwangere vrouwen ook een positieve reactie kan geven; zij laten echter de mogelijkheid open, dat een negatieve reactie zwangerschap wellicht met zekerheid kan uitsluiten. In 1934 vond Szüsz, dat urine van mannen ook positieve reacties kan geven; ook hij is van meening, dat een negatieve reactie een bewijs voor de afwezigheid van zwangerschap kan zijn. Kleiner, Weisman, Mishkind en Barowsky (1935, 1936) constateerden, dat een positieve reactie niet alleen door urine van niet-zwangere vrouwen veroorzaakt kan worden, doch ook door urine van vrouwen, de zich in het post-climacterium bevinden en mannen. Bovendien stelden zij vast, dat zwangeren-urine niet altijd een positieve reactie geeft.

Kanter c.s. verklaarde in 1936, dat hij de bittervoorn-test in 1934 niet als zwangerschapstest geproclameerd heeft. Terecht wijst Kleiner c.s. er in 1937 op, dat in de publicatie van Kanter verschillende passages voorkomen, waaruit ondubbelzinnig blijkt, dat naar zijn meening de legbuistest ook voor de aantooning van zwangerschap geschikt zou zijn. Een dezer passages uit de publicatie van Kanter luidt: „We feel... that the test upon the bitterling will prove of value as an aid in diagnosis where ectopic pregnancy... is suspected." Intra- en extrauterine graviditeit zijn echter op grond eener hormoonanalyse tot nu toe niet te diagnostiseeren, zoodat de legbuistest, indien deze bij een buitenbaarmoederlijke zwangerschap positief is, dit ook bij een intrauterine moet zijn.

De meening, dat een negatieve legbuisreactie van klinische beteekenis zou zijn en de positieve daarentegen niet, werd in 1937 wederom versterkt door een onderzoek van Markus. Hij onderzocht een 100-tal urines van gravide vrouwen en vond in 80 % een positieve legbuisreactie. Urine van niet-zwangere vrouwen gaf in 96 % der gevallen een negatieve reactie. Volgens Marcus is de differentiëel-diagnostische beteekenis van een negatieve uitslag van de legbuistest van evenveel waarde als een negatieve uitslag der reactie volgens Aschheim en Zondek.

Op een vergadering der Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie te Berlijn (14 Mei 1937) laat Stiasny zich wederom in zeer positieve richting uit over de beteekenis van het bittervoorntje voor de aantooning van zwangerschap. Een referaat uit

de Dtsch. med. Wchschr., No. 40, bl. 1534, 1937, geeft zijn mededeeling als volgt weer:

„Nach Hinzufügen von Schwangerenurin zum Aquariumwasser von Bitterlingen kommt es zu einer Verlängerung der Legeröhre dieser Fische, welche nach 24—48 Stunden so beträchtlich ist, dass daraus Diagnosen gestellt werden können. Diese Schwangerschaftsreaktion ist also schneller beendet und billiger als das Verfahren von Aschheim und Zondek... In einem auffallend hohen Prozentsatz ist auch bei Extrauteringravidität die Probe positiv: Auch bei tragenden Stuten, Hündinnen, Schweinen und Meerschweinchen konnte durch die Probe eine Schwangerschaft nachgewiesen werden..."

Dat men geneigd is geloof te hechten aan de waarde van de legbuistest voor de bepaling van zwangerschap blijkt uit de nabespreking, waarbij Gohrband o.a. opmerkt, dat hij gelooft, ... dass mit dem Verfahren noch auf viele Fragen, besonders auf erbbiologischem Gebiet, Licht geworfen werden könne." Wegens snelheid van uitvoering en billijkheid acht hij de legbuistest thans reeds beter dan de reactie volgens Aschheim en Zondek.

Het is noodig erop te wijzen, dat de hierboven genoemde onderzoekers de legbuistest op zeer primitieve en niet uniforme wijze uitgevoerd*) hebben, zoodat het positieve resultaat van de een, door de ander als negatief geïnterpreteerd kan worden; de door de verschillende onderzoekers opgegeven waarden zijn onderling meestal niet vergelijkbaar.

Uit het bovenstaande blijkt, dat er verschil van meening bestaat omtrent de waarde van de legbuistest als zwangerschapsdiagnosticum. Het leek nu van belang volgens een exacte werkwijze na te gaan hoe het met bovengenoemd vraagstuk gesteld is.

2) Vraagstelling.

Het onderzoek naar de bruikbaarheid van het vrouwelijke bittervoorntje voor de diagnose van zwangerschap valt uiteen in de twee volgende vragen:

*) Zie kritiek op blz. 40.

1. Wat zijn de kenmerken der werkzame substantie uit de urine, die de legbuisgroei veroorzaakt?
2. Wordt deze substantie tijdens zwangerschap in een zooveel hoogere concentratie dan bij afwezigheid van zwangerschap uitgescheiden, dat op grond hiervan de diagnose kan plaats vinden?

Kanter laat de aard van het werkzame bestanddeel in het midden en spreekt van „some estrogenic substance". Uit het voorgaande onderzoek is gebleken, dat de bedoelde stof het luteïdine is, waarvan men niet weet of het bij het zoogdier een oestrogene werking heeft. De vraag is dus of het luteïdine tijdens zwangerschap in een hoogere concentratie dan bij afwezigheid van zwangerschap wordt uitgescheiden.

3) Experimenteel gedeelte.

Om deze vraag te kunnen beantwoorden werd de urine van 113 patiënten (68 zwangeren en 45 niet-zwangeren) op luteïdinegehalte onderzocht. Uit de hierbij verkregen gegevens kan een definitieve conclusie omtrent de juistheid van de bewering van Kanter c.s. getrokken worden.

Het onderzochte patiënten-materiaal valt in de volgende series uiteen:

Serie I. De reactie volgens Aschheim en Zondek was positief. De zwangerschap werd door navraag bevestigd.

Serie II. De reactie volgens Aschheim en Zondek was negatief. Bij navraag bleek er echter toch een zwangerschap te bestaan.

Serie III. De reactie volgens Aschheim en Zondek werd niet verricht. Op klinische gronden stond de graviditeit echter vast. De navraag bevestigde het aanwezig zijn van zwangerschap.

Serie IV. De reactie volgens Aschheim en Zondek was negatief. De afwezigheid van zwangerschap werd door navraag bevestigd.

Van serie I (35 patiënten), serie II (3 patiënten) en serie III (30 patiënten), dus totaal 68 patiënten, stond de aanwezigheid eener graviditeit absoluut vast.

Van serie IV (42 patiënten) stond de afwezigheid van graviditeit met volkomen zekerheid vast.

De volgende opstelling bevat dus 68 zwangere en 42 niet-zwangere patiënten.

De aan de rechter zijde van de volgende opstelling voorkomende getallen geven aan, de in A.E. gemeten legbuisgroei, die tengevolge van het, in 3 ccm urine aanwezige en aan 750 ccm water toegevoegde, luteïdine ontstaan is. Zoo noodig werd de urine verdund ter verkrijging van binnen de testmarge liggende reactie-grootten.*)

Serie I . De reactie volgens Aschheim en Zondek was positief. De zwangerschap werd door navraag bevestigd.

No 1
Patiënte P 22, 1-para, zwangerschap 3e mnd.
Inzending urine 21-4-36 met vraag: graviditeit nog intact? 0 A.E.
Navraag October '36 patiënte is bevallen.

No 2
Patiënte P 20, 0-para, zwangerschap 2e mnd.
Inzending urine 8-5-36 met vraag: graviditeit? 0 A.E.
Navraag October '36: de uterus groeide en er volgden andere zwangerschapsverschijnselen.

No 3
Patiënte Sn 14, 7-para, zwangerschapsmaand?
Inzending urine 24-7-36 met vraag: extra uterine graviditeit? 0 A.E.
Navraag September '36: Intrauterine graviditeit, duur nog niet te bepalen.

No 4
Patiënte R 17, 0-para, zwangerschapsmaand?
Inzending urine 24-7-36 met vraag: graviditeit? 0 A.E.
Navraag November '36: patiënte is gravide.

*) De opgegeven waarden stellen het gemiddelde voor van de reacties van 18—36 visschen.

No 5
Patiënte A 1258, ?-para, zwangerschapsmaand?
Inzending urine 7-7-36 met vraag: graviditeit? Er bestaat fluxus. Navraag October '36: medio Augustus was er een spontane miskraam met nog levend kind. 0,1 A.E.

No 6
Patiënte R 31, 4-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 10-9-36 met vraag graviditeit? 0,1 A.E.
Navraag November '36: Er was een spontane abortus.

No 7
Patiënte T. J., ?-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 7-7-36 met vraag: graviditeit? 0,8 A.E.
Navraag September '36: volgens huisarts nog zwanger.

No 8
Patiënte P 10, ?-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 2-4-36 met vraag: graviditeit? 1 A.E.
Navraag October '36: de reactie volgens A. en Z. was goed. Er was een abortus provocatus.

No 9
Patiënte A 936, ?-para, zwangerschapsmaand?
Inzending urine Mei 1936 met vraag: is de voor zwangerschap karakteristieke hormoonspiegel normaal? 1 A.E
Navraag October '36: tijdens de opzending der urine leefde het embryo goed.

No 10
Patiënte P 5, 0-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 5-3-36 met vraag: graviditeit? 1,1 A.E.
Navraag October '36: levend kind geboren.

No 11
Patiënte A 986, ?-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine Juni 1936 met vraag: graviditeit? 1,1 A.E.
Navraag October '36: normale graviditeit.

No 12
Patiënte P 7, 0-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 5-3-36 met vraag: graviditeit? 1,2 A.E.
Navraag October '36: levend kind geboren.

No 13
Patiënte Dr. 4, 2-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 22-6-36 met vraag: graviditeit of menopause? 1,2 A.E.
Navraag October '36: zwangerschap nog aanwezig.

No 14
Patiënte R 29, 0-para, zwangerschap 3de mnd.
Inzending urine 24-8-36 met vraag: graviditeit? 1,4 A.E.
Navraag November '36: er bestond graviditeit.

No 15
Patiënte R 1, 0-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 19-5-36 met vraag: graviditeit? 1,8 A.E.
Navraag November '36: er bestond graviditeit.

No 16
Patiënte R 15, ?-para, zwangerschap 4de mnd.
Inzending urine 13-7-36 met vraag: graviditeit? 1,8 A.E.
Navraag November '36: er bestond graviditeit.

No 17
Patiënte R 18, multi-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 18-7-36 met vraag: graviditeit? 1,8 A.E.
Navraag November '36: graviditeit aanwezig, doch later is abortus opgetreden.

No 18
Patiënte P 9, 3-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 5-3-36 met vraag: extrauterine graviditeit? 1,9 A.E.
Navraag October '36 er bestond graviditeit, later is abortus opgetreden.

No 19
Patiënte A 970, ?-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine Mei 1936 met vraag: graviditeit? 1,9 A.E.
Navraag October '36: er bestond graviditeit.

No 20
Patiënte P 24 0-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 22-5-36 met vraag: graviditeit? 2 A.E.
Navraag October '36: er bestond graviditeit.

No 21
Patiënte R 14, 2-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 6-7-36 met vraag: graviditeit? 2 A.E.
Navraag November 1936: er bestond graviditeit.

No 22
Patiënte T. M. V., ?-para, zwangerschap 3de mnd.
Inzending urine 4-9-36 met vraag: graviditeit intact? 2,3 A.E.
Navraag October '36: er bestond graviditeit.

No 23
Patiënte P 16, 0-para, zwangerschap 3de mnd.
Inzending urine 11-5-36 met vraag: graviditeit? 2,7 A.E.
Navraag October 1936: graviditeit verloopt normaal.

No 24
Patiënte M. D., 0-para, zwangerschap
3de mnd. Inzending urine 22-5-36 met vraag: graviditeit 2,8 A.E.
intact? Navraag December '36: op 26-11-36 werd levend
meisje geboren.

No 25
Patiënte Sn 9, 1-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 28-4-36 met vraag: graviditeit? 3,1 A.E.
Navraag Juni '36: er bestond graviditeit.

No 26
Patiënte R 5, 2-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 5-6-36 met vraag: graviditeit intact? 3,4 A.E.
Navraag November '36: in de 4e zwangerschapsmaand
is abortus opgetreden.

No 27
Patiënte R 13, 2-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 2-7-36 met vraag: graviditeit? 3,4 A.E.
Navraag November '36: graviditeit verloopt normaal.

No 28
Patiënte A 778, ?-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine Mei 1936 met vraag: graviditeit? 4,3 A.E.
Navraag October '36: er bestond graviditeit.

No 29
Patiënte A 1335, ?-para, zwangerschapsmaand?
Inzending urine 16-7-36 met vraag: graviditeit? 4,4 A.E.
Navraag October '36: zwangerschap aanwezig.

No 30
Patiënte R 7, 6-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 8-3-36 met vraag: graviditeit? 4,5 A.E.
Navraag September '36: Patiënte zal op 3-10-'36 waarschijnlijk a terme zijn.

No 31
Patiënte Sc. 2, 3-para, zwangerschap 4e mnd.
Inzending urine 22-4-36 met vraag: graviditeit? (iets gevloeid). Navraag October '36: de graviditeit heeft zich verder normaal ontwikkeld. 4,8 A.E.

No 32
Patiënte R 8, 4-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 8-6-36 met vraag: graviditeit? 4,8 A.E.
Navraag November '36: er bestond graviditeit, later is abortus opgetreden.

No 33
Patiënte Dr 12, 3-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 12-8-36 met vraag: graviditeit? 4,9 A.E.
Navraag October '36: Patiënte lijdt aan habitueele abortus. Uitstooting ei op 26-9-36.

No 34
Patiënte A 853, ? para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine Mei 1936 met vraag: graviditeit? 5,4 A.E.
Navraag October '36: graviditeit nog aanwezig.

No 35
Patiënte Sc 6, 3-para, zwangerschap 3de mnd.
Inzending urine 10-6-36 met vraag: mola-graviditeit? 6,6 A.E.
Navraag 8-10-36: er bestond graviditeit, later is abortus van gemelli opgetreden.

Serie II. De reactie volgens Aschheim en Zondek was negatief. Bij navraag bleek er echter toch een zwangerschap te bestaan.

No 36
Patiënte B 8, 3-para, zwangerschap 2de mnd
Inzending urine 15-7-36 met vraag: Er zijn bloedingen, 1 A.E.
extrauterine graviditeit? Navraag October '36: de negatieve reactie kon niet bevestigd worden, want er was een tuba-graviditeit.

No 37
Patiënte R 10, 1-para, zwangerschap 2e mnd.
Inzending urine 18-6-36 met vraag: graviditeit? 1,9 A.E.
Navraag November '36: de negatieve reactie kon niet bevestigd worden, want er bestond graviditeit.
Later is abortus opgetreden.

No 38
Patiënte A 1157, ?-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 23-6-36 met vraag: graviditeit of myoom?
Navraag October '36: de negatieve reactie kon nie be- 2,2 A.E.
vestigd worden. Er bestond een graviditeit van 5½ mnd., te rekenen naar de grootte van uterus; er was geen myoom.

Serie III. De reactie volgens Aschheim en Zondek werd niet verricht. Op klinische gronden stond de graviditeit echter vast. De navraag bevestigde de zwangerschap.

No 39
Patiënte Sn 21, 2-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 12-3-36: Pyelitis, koorts. Normale gra-

viditeit. Navraag September '36: bevallen op 21-3-36 van levend meisje met een gewicht van 3040 gr. Placenta praevia. 0.3 A.E.

No 40
Patiënte R 6, multi-para, zwangerschap 4de mnd.
Inzending urine 27-3-36: normale graviditeit. 0,8 A.E.
Navraag September '36: in de kliniek a terme van levend kind bevallen.

No 41
Patiënte Sn 15, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 5-3-36: normale graviditeit. 1 A.E.
Navraag September '36: bevallen op 18-3-36 van levend jongetje, gewicht 3130 gr.

No 42
Patiënte R 4, 4-para, zwangerschap 5de mnd.
Inzending urine 18-3-36: normale graviditeit. 1,1 A.E.
Navraag September '36: in kliniek van levend kind bevallen.

No 43
Patiënte R 1, 5-para, zwangerschap 5de mnd.
Inzending urine 18-3-36: normale graviditeit. 1,3 A.E.
Navraag September '36: in de kliniek a terme van levend kind bevallen.

No 44
Patiënte Sn 99, 1-para, zwangerschap 8e mnd.
Inzending urine 19-2-36: Pyelitis. Normale graviditeit. 1,5 A.E.
Navraag September '36: op 13-3-36 bevallen van een levend jongetje, gewicht 3290 gr.

No 45
Patiënte Sc 3, 1-para, zwangerschap 4de mnd.
Inzending urine 16-4-36: normale graviditeit. 1,6 A.E.
Navraag October '36: normale graviditeit gebleven, thans a terme.

No 46
Patiënte Sn 23, 5-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 12-3-36: normale graviditeit. 1,7 A.E.
Navraag September '36: op 15-3-36 bevallen van een levend meisje, gewicht 3430 gr.

No 47
Patiënte Sn 13, 1-para. zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 5-3-36: normale graviditeit. 1,7 A.E.
Navraag September '36: op 23-3-36 van gemacereerd meisje bevallen, gewicht 3760 gr.

No 48
Patiënte Sn 19, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 12-3-36: Gemelli? 1,8 A.E.
Navraag September '36: op 23-3-36 bevallen van 2 lenvende jongetjes, gew. resp. 4060 en 3650 gr.

No 49
Patiënte Sn 4, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 19-2-36: normale graviditeit? 1,9 A.E.
Navraag September '36: op 4-3-36 bevallen van levend meisje, gewicht 3000 gr.

No 50
Patiënte D 1, 7-para, zwangerschap 7de mnd.
Inzending urine 27-5-36: normale graviditeit. 2 A.E.
Navraag Augustus '36: a terme van levend kind bevallen.

No 51
Patiënte Sn 6, 2-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 19-2-36: normale graviditeit. 2 A.E.
Navraag September '36: op 22-2-36 bevallen van levend meisje, gewicht 2730 gr.

No 52
Patiënte Sn 16, 1-para, zwangerschap 3de mnd.
Inzending urine 5-3-36: Zoutloos diëet. 2,1 A.E.
Navraag September '36: vóór bevalling met intacte graviditeit uit de kliniek ontslagen.

No 53
Patiënte Sn 5, 1-para, zwangerschap 8e mnd.
Inzending urine 19-2-36: normale graviditeit. 2,3 A.E.
Navraag September '36: op 5-4-36 bevallen van levend jongetje, gewicht 3850 gr.

No 54
Patiënte Sn 14, 2-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 5-3-36: Zoutloos diëet. 2,6 A.E.
Navraag September '36: op 6-3-36 bevallen van levend meisje, gewicht 3450 gr.

No 55
Patiënte R 3, 1-para, zwangerschap 7de mnd.
Inzending urine 19-3-36: normale graviditeit. 2,8 A.E.
Navraag September '36: patiënte is thuis bevallen.

No 56
Patiënte 106, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 19-2-36: normale graviditeit. 2,8 A.E.
Navraag September '36: op 23-2-36 bevallen van levend meisje, gewicht 2940 gr.

No 57
Patiënte Sn 7, 1-para, zwangerschap 3de mnd.
Inzending urine 25-2-36: Hyperemesis. 2,8 A.E.
Navraag September '36: patiënte is thuis bevallen.

No 58
Patiënte B. B., 1-para, zwangerschap 6de mnd.
Inzending urine November '37: normale graviditeit. 2,8 A.E.
Navraag Februari '38: a terme van levend meisje bevallen.

No 59
Patiënte Sn 9, 1-para, zwangerschap 7de mnd.
Inzending urine 26-2-36: Hypertensie. 3,3 A.E.
Navraag September '36: zware intoxicatie, kunstmatige verlossing.

No 60
Patiënte Sn 3, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 19-2-36: Hypertensie. 3,4 A.E.
Navraag September '36: op 21-2-36 bevallen van levend jongetje, gewicht 3000 gr.

No 61
Patiënte Sn 18, 2-para, zwangerschap 2de mnd.
Inzending urine 12-3-36: Hyperemesis. 3,7 A.E.
Navraag September '36: zwangerschap intact.

No 62
Patiënte D 2, 4-para, zwangerschap 8e mnd.
Inzending urine 15-4-36: dreigende abortus gehad. 3,8 A.E.
Navraag Augustus '36: a terme bevallen van levend kind, anencephalus.

No 63
Patiënte Sn 22, 5-para, zwangerschap 8e mnd.
Inzending urine 12-3-36: normale graviditeit. 3,8 A.E.
Navraag September '36: op 9-4-36 bevallen van levend meisje, gewicht 3640 gr.

No 64
Patiënte R 5, 2-para, zwangerschap 5de mnd.
Inzending urine 18-3-36: normale graviditeit. 3,9 A.E.
Navraag September '36: Patiënte is thuis bevallen.

No 65
Patiënte Sn 20, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 12-3-36: normale graviditeit. 4 A.E.
Navraag September '36: op 19-3-36 bevallen van levend jongetje, gewicht 3600 gr.

No 66
Patiënte Sn 11, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 26-2-36: normale graviditeit. 4,1 A.E.
Navraag September '36: op 29-2-36 bevallen van levend meisje, gewicht 3430 gr.

No 67
Patiënte Sn 17, 2-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 5-3-36: Plancenta praevia. 4,1 A.E.
Navraag September '36: op 6-3-36 bevallen van levend jongetje, gewicht 3340 gr.

No 68
Patiënte Sn 12, 1-para, zwangerschap 9de mnd.
Inzending urine 26-2-36: normale graviditeit. 4,3 A.E.
Navraag September '36: op 13-3-36 bevallen van levend meisje, gewicht 3160 gr.

Serie IV. De reactie volgens Aschheim en Zondek was negatief. De afwezigheid van zwangerschap werd door navraag bevestigd.

No 69
Patiënte A 798, ?-para
Inzending urine April '36: oorzaak der bloedingen? 0 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen graviditeit.

No 70
Patiënte Sn 24, ?-para
Inzending urine 12-3-36: extra uterine graviditeit? 0 A.E.
Navraag September '36: er was geen zwangerschap. Het geval werd klinisch als menstruatiestoornis opgevat.

No 71
Patiënte P 1, 1-para
Inzending urine 2-4-36 met vraag: jonge graviditeit? 0 A.E.
Navraag October '36: er was na 3 maanden geen vergrootte uterus, dus geen zwangerschap.

No 72
Patiënte P 14, 5-para
Inzending urine 20-4-36 met vraag: jonge graviditeit? 0 A.E.
Navraag October '36: er waren ook later geen zwangerschapsverschijnselen.

No 73

Patiënte R 2, 2-para

Inzending urine 19-5-36 met vraag: jonge graviditeit? 0 A.E.
Navraag November '36: Patiënte is op 23-6-36 geopereerd, waarbij een groote rechtszijdige ovariaalcyste is weggenomen.

No 74

Patiënte P 17, 1-para

Inzending urine 28-5-36 met vraag: nog abortus-resten aanwezig? Navraag October '36: er was na de abortus geen nieuwe zwangerschap. 0 A.E.

No 75

Patiënte A 1327, ?-para

Inzending urine 15-7-36 met vraag: differentiëele diagnose tusschen hydrosalpinx en extra uterine graviditeit? 0 A.E.
Navraag October '36: er bleek tenslotte uitsluitend een hydrosalpinx te bestaan.

No 76

Patiënte A 1384, ?-para

Inzending urine 24-7-36 met vraag: patiënte wilde weten of ze zwanger was, 8 dagen na coïtus. 0 A.E.
Navraag October '36: er zijn geen zwangerschapsverschijnselen ontstaan.

No 77

Patiënte A 1430, ?-para

Inzending urine 30-7-36 met vraag: jonge gradiviteit? 0 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen graviditeit.

No 78

Patiënte R 26, 6-para

Inzending urine 21-8-36 met vraag: graviditeit nog intact? 0 A.E.
Navraag November '36: op 29-8-36 werd een totaal gemacereerde foetus verwijderd.

No 79
Patiënte A 1605, ?-para
Inzending urine 27-8-36 met vraag: jonge graviditeit? 0 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen graviditeit.

No 80
Patiënte R 12, 1-para
Inzending urine 30-6-36 met vraag: graviditeit of chorionepithelioom? 0,1 A.E.
Navraag November '36: er bestond geen graviditeit noch chorionepithelioom.

No 81
Patiënte B 6, ?-para
Inzending urine 17-7-36 met vraag: graviditeit? 0,1 A.E.
Navraag October '36: uit het latere klinische verloop bleek, dat er geen zwangerschap bestond.

No 82
Patiënte A 998, ?-para
Inzending urine Mei '36 met vraag: graviditeit? 0,2 A.E.
Navraag October '36: uit het latere klinische verloop bleek, dat er geen zwangerschap bestond.

No 83
Patiënte P 8, ?-para
Inzending urine 26-3-36 met vraag: jonge graviditeit? 0,2 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen zwangerschap.

No 84
Patiënte A 708, ?-para
Inzending urine April '36 met vraag: graviditeit? 0,3 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen zwangerschap.

No 85
Patiënte P 6, 1-para
Inzending urine 12-3-36 met vraag: jonge graviditeit? 0,3 A.E.
Navraag October '36; er bestond geen zwangerschap.

No 86
Patiënte P 2, 0-para
Inzending urine 16-4-36 met vraag: graviditeit? 0,3 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen graviditeit.

No 87
Patiënte Sc. 10, 4-para
Inzending urine 19-5-36: missed abortion. 0,3 A.E.
Navraag October '36: Laminariastift ingebracht gaf spontane geboorte van een totaal ingedroogde en gemummificeerde vrucht plus placenta. De uterus had de grootte van die bij een graviditeit van 3 à 3½ maand.

No 88
Patiënte P 15, 0-para
Inzending urine 22-5-36 met vraag: jonge graviditeit? 0,3 A.E.
Navraag October '36: uterus groeide niet; patiënte menstrueerde weer normaal.

No 89
Patiënte P 13, ?-para
Inzending urine 16-7-36 met vraag: jonge graviditeit? 0,4 A.E.
Navraag October '36: uterus groeide niet; patiënte menstrueerde weer normaal.

No 90
Patiënte A 1241, ?-para
Inzending urine 4-7-36 met vraag: jonge graviditeit? 0,5 A.E.
Navraag October '36: geen zwangerschap, menses weer spoedig opgetreden.

No 91
Patiënte Sn 8, ?-para
Inzending urine 24-5-36 met vraag: graviditeit? 0,6 A.E.
Navraag September '36: geen zwangerschap, doch pyosalpinx sinistra.

No 92
Patiënte B 7, ?-para
Inzending urine 15-7-36 met vraag: graviditeit? 0,6 A.E.

Navraag October '36: uit de klinische gegevens bleek, dat er geen zwangerschap bestond.

No 93
Patiënte Dr. 10, 1-para
Inzending urine 3-9-36 met vraag: graviditeit? 0,6 A.E.
Navraag October '36: weer twee maal normaal gemenstrueerd.

No 94
Patiënte P 3, 0-para
Inzending urine 21-3-36 met vraag: jonge graviditeit? 0,8 A.E.
Navraag October '36: er waren verder geen zwangerschapsverschijnselen.

No 95
Patiënte R 27, ?-para
Inzending urine 24-8-36 met vraag: jonge graviditeit? 0,8 A.E.
Navraag November '36: er waren verder geen zwangerschapsverschijnselen.

No 96
Patiënte A 696, ?-para
Inzending urine April '36 met vraag: graviditeit? 0,9 A.E.
Navraag October '36: er waren verder geen zwangerschapsverschijnselen.

No 97
Patiënte A 965, ?-para
Inzending urine Mei '36 met vraag: graviditeit? 1,1 A.E.
Navraag October '36: geen zwangerschap, menses weer spoedig opgetreden.

No 98
Patiënte P 4, 0-para
Inzending urine 9-3-36 met vraag: extra uterine graviditeit? 1,1 A.E.
Navraag October '36: er waren verder geen zwangerschapsverschijnselen.

No 99
Patiënte A. B., ?-para
Inzending urine 16-6-36: normale, niet-zwangere vrouw, normale menses. 1,3 A.E.

No 100
Patiënte P 11, ?-para
Inzending urine 7-3-36 met vraag: extra uterine graviditeit? 1,5 A.E.
Navraag April '36: corpus luteumcyste operatief verwijderd; geen zwangerschap.

No 101
Patiënte Dr 6, ?-para
Inzending urine 23-6-36 met vraag: graviditeit of menopause? 2 A.E.
Navraag October '36: patiënte heeft inmiddels weer normaal gemenstrueerd.

No 102
Patiënte A 989, ?-para
Inzending urine Mei '36 met vraag: graviditeit? 2,1 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen graviditeit.

No 103
Patiënte A., ?-para
Inzending urine 11-6-36: normale, niet zwangere vrouw, normale menses. 2,3 A.E.

No 104
Patiënte R 28, 6-para
Inzending urine 24-8-36 met vraag: graviditeit nog intact?
Navraag November '36: de zwangerschap was niet meer intact, want op 25-8-36 werd een totaal gemacereerd foetus (van 25 cm) geboren, terwijl patiënte a terme had moeten zijn. De vrucht was niet ouder dan 5 maanden. 2,4 A.E.

No 105
Patiënte A 1338, ?-para
Inzending urine 17-7-36 met vraag: graviditeit? 2,6 A.E.

Navraag October '36: er was geen zwangerschap, doch een hersentumor. Patiënte is comateus gestorven.

No 106
Patiënte A 1412 ?-para
Inzending urine 28-7-36 met vraag: graviditeit? 2,6 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen zwangerschap.

No 107
Patiënte P 23, 1-para
Inzending urine 16-4-26 met vraag: graviditeit? 2,8 A.E.
Navraag October '36: er waren verder geen zwangerschapsverschijnselen.

No 108
Patiënte A 1367 ?-para
Inzending urine 22-7-36 met vraag: graviditeit? 3,1 A.E.
Navraag October '36: er waren verder geen zwangerschapsverschijnselen.

No 109
Patiënte A 868, ?-para
Inzending urine Mei 1936 met vraag: graviditeit? 3,4 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen zwangerschap.

No 110
Patiënte R 22, 0-para
Inzending urine 14-8-36 met vraag: graviditeit? 3,6 A.E.
Navraag November '36: er bestond geen zwangerschap.

No 111
Patiënte A 1540 ?-para
Inzending urine 17-8-36 met vraag: graviditeit? 3,7 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen zwangerschap.

No 112
Patiënte A 919, ?-para
Inzending urine Mei '36 met vraag: graviditeit? 4,5 A.E.
Navraag October '36: er bestond geen zwangerschap.

Onder de gegeven proefomstandigheden gaf 3 ccm urine, toegevoegd aan 750 ccm water, dus de volgende reacties :

TABEL XXI

68 gravide vrouwen :				45 niet-gravide vrouwen :			
4	maal	0	A.E.	11	maal	0	A.E.
2	„	0,1	„	2	„	0,1	„
0	„	0,2	„	2	„	0,2	„
1	„	0,3	„	5	„	0,3	„
0	„	0,4	„	1	„	0,4	„
0	„	0,5	„	1	„	0,5	„
0	„	0,6	„	3	„	0,6	„
2	„	0,8	„	2	„	0,8	„
0	„	0,9	„	1	„	0,9	„
4	„	1,0	„	0	„	1,0	„
3	„	1,1	„	2	„	1,1	„
2	„	1,2	„	0	„	1,2	„
1	„	1,3	„	1	„	1,3	„
1	„	1,4	„	0	„	1,4	„
1	„	1,5	„	1	„	1,5	„
1	„	1,6	„	0	„	1,6	„
2	„	1,7	„	0	„	1,7	„
4	„	1,8	„	0	„	1,8	„
4	„	1,9	„	0	„	1,9	„
4	„	2,0	„	1	„	2,0	„
1	„	2,1	„	1	„	2,1	„
1	„	2,2	„	0	„	2,2	„
2	„	2,3	„	1	„	2,3	„
0	„	2,4	„	1	„	2,4	„
1	„	2,6	„	3	„	2,6	„
1	„	2,7	„	0	„	2,7	„
5	„	2,8	„	1	„	2,8	„
1	„	3,1	„	1	„	3,1	„
1	„	3,3	„	0	„	3,3	„
3	„	3,4	„	1	„	3,4	„
0	„	3,6	„	1	„	3,6	„
1	„	3,7	„	1	„	3,7	„
2	„	3,8	„	0	„	3,8	„
1	„	3,9	„	0	„	3,9	„
1	„	4,0	„	0	„	4,0	„
2	„	4,1	„	0	„	4,1	„
0	„	4,2	„	0	„	4,2	„
2	„	4,3	„	0	„	4,3	„
1	„	4,4	„	0	„	4,4	„
1	„	4,5	„	1	„	4,5	„
2	„	4,8	„				
1	„	4,9	„				
1	„	5,4	„				
1	„	6,6	„				

4) Kan de luteïdine-concentratie in de urine als criterium gelden voor een eventueele graviditeit?

Uit de bovenstaande opstelling blijkt, dat zoowel bij de gravide als de niet-gravide vrouwen, luteïdine-concentraties van 0—4,5 A.E. voorkomen. Binnen het traject van 0—4,5 A.E. kan de urine dus zoowel van een gravide als een niet-gravide vrouw afkomstig zijn.

Daar meer dan 95 % van het onderzochte materiaal binnen dit traject valt is het duidelijk, dat de luteïdine-concentratie in urine geen criterium voor een eventueele graviditeit kan zijn.

5) Hoe groot is de kans op de aanwezigheid eener graviditeit bij verschillende luteïdine-concentraties?

De vraag kan gesteld worden, of een bepaalde luteïdine-concentratie wellicht zooveel vaker bij gravide dan bij niet-gravide vrouwen voorkomt, dat hierop een kansberekening ten aanzien van een eventueel aanwezige zwangerschap gebaseerd kan worden.

Om dit te kunnen beoordeelen is het procentueele aantal malen dat een reactie van 0-1, 1-2, ... 6-7 A.E. bij gravide vrouwen (serie I, II, III) gevonden werd, vergeleken met het aantal malen dat deze reacties voorkomen bij de categorie der niet-zwangere (serie IV). Onderstaande opstelling en de daarbij behoorende figuur 108 illustreeren het verband.

De procentueele frequentie is bij :

100 gravide vrouwen :			100 niet-gravide vrouwen :		
13	maal	0—1 A.E.	62	maal	0—1 A.E.
34	,,	1—2 A.E.	9	,,	1—2 A.E.
22	,,	2—3 A.E.	18	,,	2—3 A.E.
13	,,	3—4 A.E.	9	,,	3—4 A.E.
15	,,	4—5 A.E.	2	,,	4—5 A.E.
2	,,	5—6 A.E.	0	,,	5—6 A.E
2	,,	6—7 A.E.			
0	,,	7—8 A.E.			

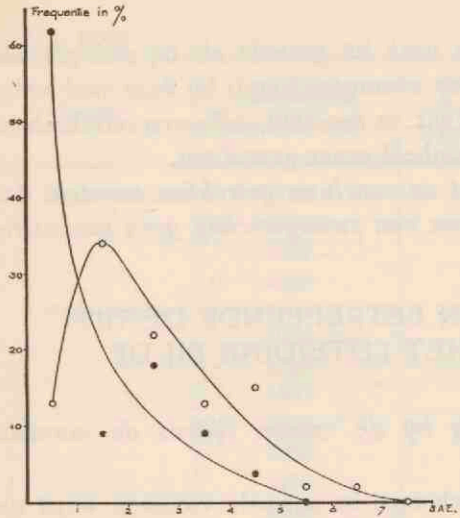


Fig. 108. De krommen geven het verband aan tusschen een bepaalde legbuisreactie. (uitgedrukt in A.E.), verkregen door toediening van 3 ccm urine aan 750 ccm water, en het aantal malen dat een dergelijke reactie gevonden werd bij urine van niet-zwangere en zwangere vrouwen. De zwarte stippen behooren bij niet-zwangere, de cirkeltjes bij zwangere vrouwen.

Een reactie van 0 A.E. wordt gevonden bij 13 % der gravide en bij 62 % der niet-gravide vrouwen. De kans, dat een vrouw, waarvan het luteïdine-gehalte der urine onder de gegeven proefomstandigheden = 0—1 A.E., zwanger is bedraagt dus $\frac{13}{75} \times 100 = 17\,\%$. *Hieruit blijkt, dat een negatieve legbuis-reactie de aanwezigheid eener graviditeit slechts met een zekerheid van 83 % uitsluit.*

Het voorgaande onderzoek heeft uitgewezen, dat de negatieve reactie volgens Aschheim en Zondek in 3 gevallen (= 6 %) onjuist en in 45 gevallen (= 94 %) juist was. Een negatieve legbuisreactie is slechts in 83 % der gevallen juist. In tegensteling tot de meening van Ehrhardt, Szüsz en Markus *is de negatieve legbuisreactie vanuit een klinisch standpunt dus van minder waarde dan de negatieve reactie volgens Aschheim en Zondek.*

Een reactie van 5—7 A.E. wordt gevonden bij 4 % der gravide en geen enkele niet-gravide vrouw. Een reactie van 5—7 A.E. zou dus met absolute zekerheid op zwangerschap kunnen wijzen. Daar een reactie binnen dit traject slechts bij 4 % der gravide vrouwen gevonden wordt heeft zij geen practische waarde.

Het snijpunt der beide krommen in fig. 108 ligt ongeveer bij 1 A.E.

Deze reactie wordt dus even vaak bij gravide als bij niet-gravide vrouwen gevonden. De kans op zwangerschap is bij deze veelvuldig voorkomende uitslag 50 %, d.w.z. er heerscht volkomen onzekerheid omtrent de eventueele aanwezigheid eener graviditeit.

Uit het bovenstaande moet de conclusie getrokken worden, dat de legbuistest voor de diagnose van zwangerschap geen practische waarde bezit.

§ 3. ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE UITSCHEIDING VAN HET LUTEIDINE BIJ DE MENSCH.

1) De luteïdine-uitscheiding bij de vrouw, tijdens de normale cyclus.

Van twee, in gynaecologisch opzicht normale vrouwen werd de per etmaal uitgescheiden urine, gedurende een maandelijksche periode op luteïdine-gehalte onderzocht. De, bij de eerste patiënte verkregen, resultaten zijn als volgt:

I. Patiënte Sch., 0-para, 34 jaar. Longtuberculose. Periode 28-30 dagen.

In figuur 109 zijn de totaal per etmaal uitgescheiden hoeveelheden luteïdine, met in spiegelbeeld de luteïdine-concentraties van de per etmaal uitgescheiden urine, weergegeven.

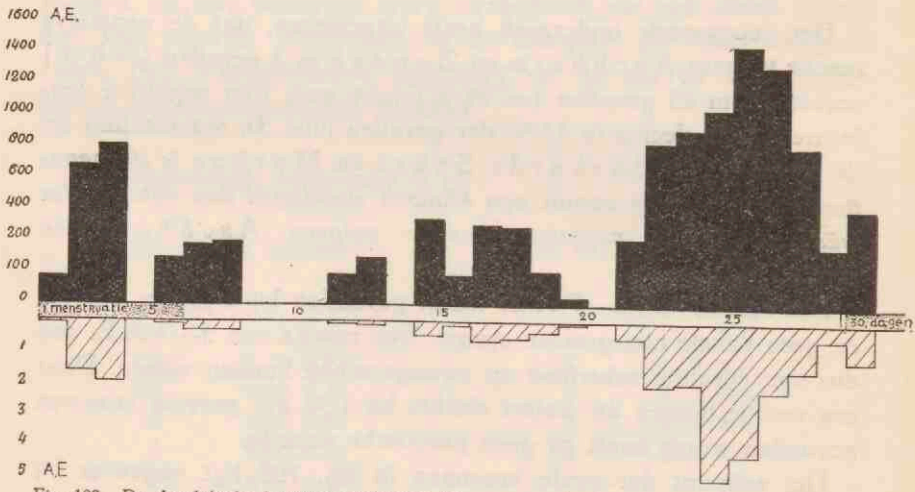


Fig. 109. De dagelijksche luteïdine-uitscheiding bij een normale niet-zwangere vrouw, gedurende één periode. In spiegelbeeld de luteïdine-concentratie per 3 ccm urine. Het maximum valt in de corpus luteum-phase.

TABEL XXII

Dagen	Hoeveelheid urine in ccm.	Aantal A.E. in 3 ccm. urine per 750 ccm. water	Totale luteidine-uitscheiding in A.E.
1 begin menstr.	1200	0,2	80
2	1200	1,7	680
3	1300	1,9	823
4	1200	0	0
5 einde menstr.	1500	0,3	150
6	900	0,6	180
7	1200	0,5	200
8	1500	0	0
9	1400	0	0
10	1200	0	0
11	1450	0,2	97
12	1500	0,3	150
13	1200	0	0
14	1200	0,9	360
15	1200	0,2	80
16	1400	0,7	327
17	1800	0,5	300
18	1200	0,3	120
19	900	0,1	30
20	1100	0	0
21	1300	0,5	217
22	1300	2	867
23	1500	1,9	950
24	650	5	1083
25	1100	4	1467
26	1600	2,5	1333
27	1650	1,5	825
28	1150	0,5	192
29 begin menstr.	1000	1,3	433
30	1300	0	0

Het blijkt, dat de luteïdine-concentratie en -uitscheiding gedurende één periode duidelijke fluctuaties vertoont. Na de menstruatie verdwijnt het bestanddeel gedurende een week bijna geheel uit de urine. Neemt men aan, dat het bersten van de follikel precies in het midden der periode plaats vindt, dan verschijnt het luteïdine omstreeks de ovulatie weer in kleine hoeveelheden in de urine. De grootste hoeveelheden vindt men echter tusschen de 6de en

14de dag na de ovulatie. Er is een duidelijk maximum op de 24ste en 25ste dag na het begin der voorgaande menstruatie.

In hoeverre deze fluctuaties in de luteïdine-uitscheiding van individueele aard zijn, leert de vergelijking der overeenkomstige gegevens van de volgende patiënte:

II. Patiënte B., 0-para, 32 jaar. Longtuberculose. Periode 27—30 dagen.

TABEL XXIII

Dagen	Hoeveelheid urine in ccm.	Aantal A.E. in 3 ccm. urine per 750 ccm. water	Totale luteidine-uitscheiding in A.E.
1 begin menstr.	1000	0,6	200
2	1200	0,6	240
3	1100	0,4	147
4	700	1,6	373
5	1300	0,4	173
6 einde menstr.	1000	0,8	267
7	1000	0,3	100
8	1000	0,3	100
9	1000	0,3	100
10	500	0,2	33
11	1000	0,1	33
12	1200	0,4	160
13	700	0,5	117
14	800	0,4	107
15	800	0,3	80
16	900	0,3	90
17	1000	0,4	133
18	1000	1	333
19	1000	1	333
20	1000	0,3	100
21	800	1,6	427
22	1200	0,7	280
23	900	1,7	510
24	1400	1,3	607
25	1000	1,4	467
26	1100	1,9	697
27	600	0,7	140
28	1000	0,7	233
29	850	1,7	482
30 begin menstr.	1100	0,4	147

Hoewel het geheele uitscheidings- en concentratie-niveau bij deze patiënte lager ligt dan bij de eerste, is de kwalitatieve overeenkomst tusschen beide gevallen onmiskenbaar (zie fig. 110). Weder-

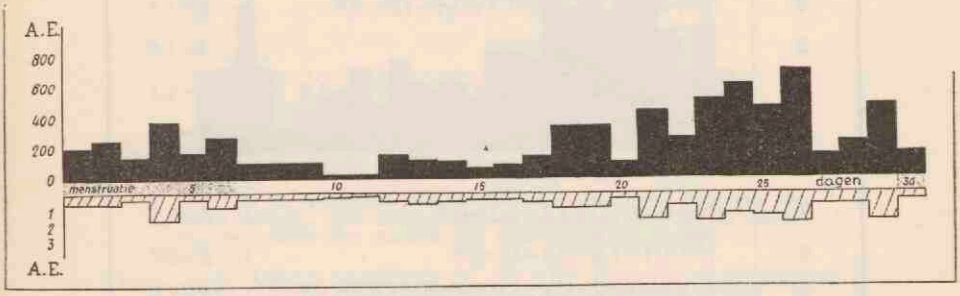


Fig. 110. De dagelijksche luteïdine-uitscheiding bij een normale niet-zwangere vrouw, gedurende één periode. In spiegelbeeld de luteïdine-concentratie per 3 ccm urine. Het maximum valt in de corpus luteum-phase.

om is het luteïdine na de menstruatie gedurende een week bijna geheel uit de urine verdwenen. Omstreeks de ovulatie neemt het hormoon-gehalte weer eenigszins toe. Tusschen de 21ste en 27ste dag na de eerste dag der voorafgaande menstruatie ligt weer het maximum.

Teneinde een grafiek te verkrijgen, welke de gemiddelde luteidine-concentratie op de verschillende dagen van de periode representeert, werd de ochtendurine van 4 normale, niet-zwangere jonge vrouwen gedurende meerdere perioden op luteïdine-gehalte onderzocht. De kortste periode, welke tijdens het verzamelen der urine voorkwam was 25, de langste 31 dagen. Om tot vergelijkbare waarden te komen, zijn de van 28 dagen afwijkende perioden herleid tot een van 28 dagen. De bij de reeds genoemde patiënten I en II gevonden waarden zijn, eveneens herleid *) tot een cyclus van 28 dagen, toegevoegd aan die, verkregen bij de 4 andere vrouwen. De opstelling is als volgt:

*) Deze herleiding geschiedde in dier voege dat, uitgaande van de eerste dag der menstruatie, berekend werd welke rangnummers de dagen eener van 28 dagen afwijkende cyclus gehad zouden hebben, indien de cyclus 28 dagen had bedragen.

TABEL XXIV

Dag v. d. periode	Luteidine concentratie per 2 ccm urine toegevoegd aan 750 ccm water in A.E.
1	(0,1+0+2,1+0,7+4,1+0,2+1,5+1+0,2+0,6): 10=1,1
2	(0+0,3+1,4+3,3+1,4+0,4+1,7+0,6): 8=1,1
3	(3,3+1,9+0,4): 3=1,9
4	(0,5+0,4+0+1,4+1,2+1,8+3,3+0+1,6): 9=1,1
5	(0,9+0+0+0,3+0,4): 5=0,3
6	(0+0,2+0,6+0,8): 4=0,4
7	(0+0+0+0+3,3+0,2+0,3): 7=0,5
8	(0+1,4+1,5+0,9+0+0,3): 6=0,7
9	(0,3+0,3+4,1+1,7+1,2+0,9+1,2+0+0,2): 9=1,1
10	(1,6+0+1,3+0,6+0,2+0,1): 6=0,6
11	(3,1+0,8+1+1,3+1,7+0,3+0,4): 7=1,2
12	(0+0,1+2,1+1,3+2,1+0+0,5): 7=0,9
13	(0,6+0,3+1,7+0,9+0,4): 5=0,8
14	(1,9+1,1+0,9+0,2+0,3): 5=0,9
15	(1,3+0+0,4+1,7+0,6+0,7+0,3): 7=0,7
16	(1,1+0,7+0,9+2,6+2,9+0,5+0,4): 7=1,3
17	(0,9+2,8+0,8+1,4+2,1+0,3+1): 7=1,3
18	(0+0,3+1,3+1+4,6+0+1): 7=1,2
19	(1,8+4,5+1,5+4,3+0+0,3): 6=2,1
20	(5,7+1,5+1,5+1,4+0,8+1,7+1,2+1,1): 8=1,9
21	(2+4,4+0,5+1,6+1,8+1,9+1,7): 7=2,0
22	(2,3+2,6+0+1,4+0+5+1,3): 7=1,8
23	(1,5+0,6+2,3+5,9+3,2+1,6+2,4+4,3+1,4): 9=2;6
24	(5,6+4,5+1,6+0,1+2,3+1,9): 6=2,7
25	(2,3+1,3+2,3+0,8+3,4+1,8+0,4+1,5+0,7): 9=1;6
26	(0,1+0,2+0+2,5+3,7+0,4+0,5+0,7): 8=1,0
27	(0+1,1+4,7+1,2+1,3+1,7): 6=1,7
28	(0,8+0,7+2,9+1,4+1,8+0,4+0+0,4): 8=1,1

Fig. 111 geeft de grafische voorstelling van de gemiddelde luteïdine-concentratie per 3 ccm urine gedurende een periode van 28 dagen weer.

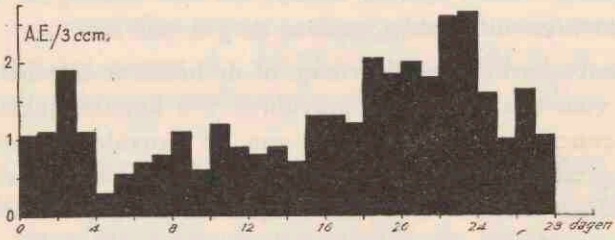


Fig. 111. De gemiddelde luteïdine-concentratie per 3 ccm urine van een aantal normale, niet-zwangere vrouwen gedurende een tot 28 dagen herleide periode. Het maximum valt in de corpus luteum-phase.

Daar deze figuur ontstaan is uit 191 luteïdine-bepalingen verricht bij de urine van verschillende vrouwen, mag aangenomen worden, dat zij de kenmerken der luteïdine-uitscheiding, bij de normale geslachtsrijpe (niet-climaterische) vrouw, op min of meer typsche wijze weergeeft.

Deze kenmerken kunnen als volgt omschreven worden:

1) Er is een sterke daling van de luteïdine-concentratie aan het einde der menstruatie,
2) Van de 6de tot de 10de dag volgt een geringe stijging in de concentratie.
3) Van de 10e tot de 16de dag (dus omstreeks de ovulatie) blijft het concentratie-niveau ongeveer constant.
4) Van de 16de tot de 25e dag stijgt de concentratie vrijwel ononderbroken tot de hoogste waarde, welke in de geheele periode voorkomt, bereikt is.
5) Van de 25ste tot de 28ste dag daalt de concentratie. Deze daling zet zich over de aansluitende menstruatie-periode verder voort.

Vergelijkt men de grafiek van fig. 111 met de overeenkomstige uitscheidingskrommen voor:

a) gonadotroop hormoon (Zondek, 1931);
b) follikelhormoon (Smith, c.s., 1938; Siebke, 1930; Frank, c.s., 1936; Pedersen-Bjergaard, 1936; Palmer, 1937-1938);

c) pregnaandiol (Venning, c.s., 1936) en
d) mannelijk hormoon (Laqueur, c.s., 1937), dan blijkt de luteïdine-kromme een geheel eigen karakter te hebben.

2) De luteïdine-uitscheiding tijdens de graviditeit.

Ter beantwoording van de vraag, of de luteïdine-uitscheiding als criterium voor een eventueele graviditeit zou kunnen gelden, is de luteïdine-concentratie in de urine van 68 gravide vrouwen over alle zwangerschapsmaanden bepaald. Van 63 vrouwen was de duur der graviditeit bekend. Rangschikt men de, bij deze vrouwen gevonden concentraties, naar de duur der zwangerschap, dan ontstaat de volgende tabel.

TABEL XXV

Zwangerschaps-maand	Aantal gravide vrouwen	Gemiddelde luteïdine-concentratie per 3 ccm. urine toegevoegd aan 750 ccm. water
2	26	2,4 A.E.
3	8	2,6 A.E.
4	4	2,3 A.E.
5	2	2,6 A.E.
6	1	2,8 A.E.
7	4	2,3 A.E.
8	4	2,9 A.E.
9	14	2,6 A.E.

Figuur 112 geeft het verband weer tusschen zwangerschapsmaand en luteïdine-concentratie der urine.

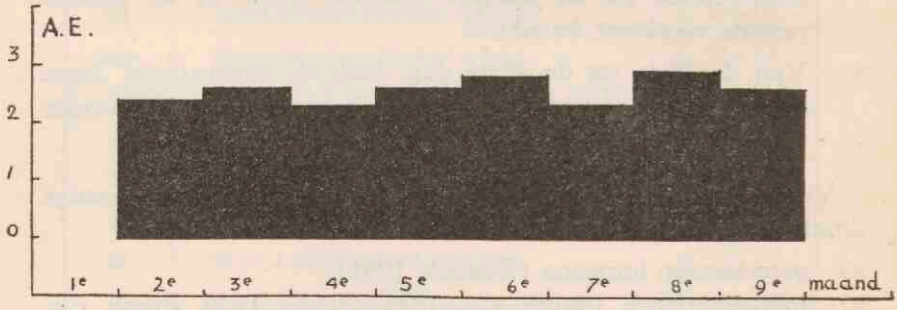


Fig. 112. De gemiddelde maandelijksche luteïdine-concentratie per 3 ccm urine van een aantal zwangere vrouwen. Gedurende de geheele graviditeit blijft het concentratie-niveau vrijwel constant.

Men ziet, dat de luteïdine-concentratie in de tweede en de laatste zwangerschapsmaand slechts weinig verschilt. In de 4e, 5e, 6e, 7e en 8e maand is er een geringe schommeling in de waarden, waarschijnlijk tengevolge van het relatief geringe aantal waarnemingen in deze maanden. Dit in aanmerking genomen mag men concludeeren, *dat het niveau der luteïdine-concentratie in de urine gedurende de geheele graviditeit practisch constant blijft.*

Toetst men deze bevinding aan hetgeen hieromtrent van het gonadotrope hormoon, het follikelhormoon en pregnaandiol bekend is, dan blijkt het volgende: Gedurende de graviditeit stijgt de concentratie van het gonadotrope hormoon, het follikelhormoon en pregnaandiol in de urine sterk. Het feit, dat de luteïdine-kromme van fig. 113 geheel horizontaal blijft loopen wijst er dus op, dat de luteïdine-uitscheidingskromme tijdens de graviditeit een geheel eigen karakter bezit.

3) De dagelijksche luteïdine-uitscheiding bij een gravide vrouw.

Bij afwezigheid van graviditeit wordt het luteïdine door de normale geslachtsrijpe vrouw op cyclische wijze uitgescheiden. Men kan nu de vraag stellen of deze cyclische uitscheiding zich tijdens de graviditeit voortzet.

Hiertoe werd van een gezonde zwangere vrouw de per etmaal uitgescheiden urine gedurende de 6e en de eerste helft van de 7e maand op luteïdine-gehalte onderzocht. De gevonden waarden zijn in tabel XXVI weergegeven.

TABEL XXVI

Dag	hoeveelheid in 24 uren uitgescheiden urine in ccm.	aantal A.E. per 3 ccm. urine toegevoegd aan 750 ccm. water	totale luteïdine-uitscheiding per dag in A.E.
1	1475	2,2	1082
2	2100	1,8	1260
3	700	2	467
4	1200	2	800
5	1325	7,2	3180
6	1500	1,3	650
7	900	3,1	930
8	1350	1,8	810
9	1350	2,2	990
10	1240	6	2480
11	1575	6	3150
12	1450	1,5	725
13	1225	2,2	898
14	1125	2	750
15	1175	2,2	863
16	1240	2	827
17	1525	1,6	813
18	2450	3,1	2532
19	1450	1,9	918
20	1400	2,4	1120
21	1300	3,2	1387
22	1825	3,5	2129
23	1290	3,3	1419
24	1500	2,9	1450
25	1890	0,7	441
26	1200	4,4	1760
27	1550	3,1	1602
28	1150	2,3	882
29	1625	1	542
30	1825	5,3	3224
31	1350	2,4	1080
32	975	3	975
33	1475	2,8	1377
34	1400	1,3	607
35	1375	1	458
36	1540	3,3	1694
37	1150	1,8	690
38	800	3,2	853
39	1025	2	683
40	900	3,2	960

In fig. 113 is de dagelijksche luteïdine-uitscheiding weergegeven. In spiegelbeeld is de luteïdine-concentratie der per etmaal uitgescheiden urine voorgesteld.

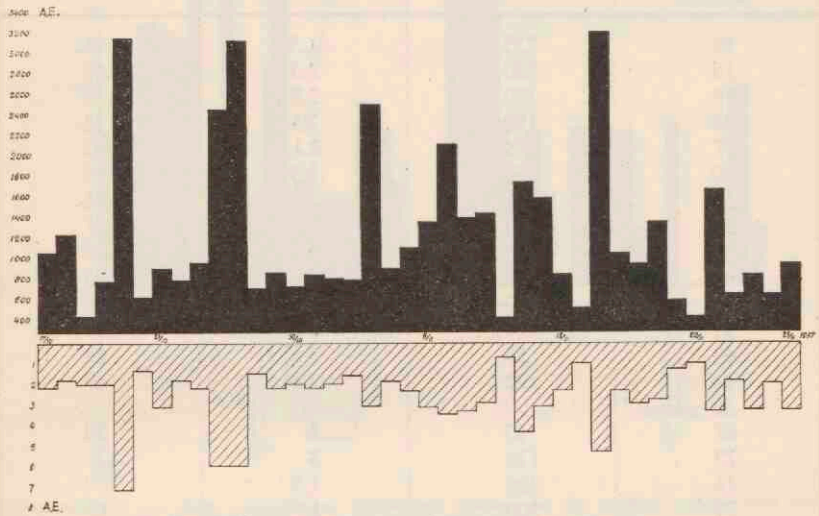


Fig. 113. De dagelijksche luteïdine-uitscheiding bij een normale zwangere vrouw, gedurende ongeveer 6 weken. In spiegelbeeld de luteïdine-concentratie per 3 ccm urine. Er is geen periodiciteit in de uitscheiding te vinden.

Er valt een groote onregelmatigheid in de luteïdine-concentratie der per etmaal uitgescheiden urine te constateeren. De onregelmatigheid in de dagelijksche luteïdine-uitscheiding is nog opvallender. Van een cyclische verandering in luteïdine-concentratie en -uitscheiding valt niets te bespeuren.

4) De luteïdine-uitscheiding bij een vrouw in partu.

Van een normale, gezonde gravida werd iedere urine-mictie, van 2 dagen vóór tot 5 dagen na de bevalling, op luteïdine-gehalte onderzocht. De gevonden waarden zijn in tabel XXVII weergegeven.

TABEL XXVII

uren waarop de micties plaatsvonden, gerekend na een tijdstip dat = 0 uur werd gesteld	hoeveelheid uitgescheiden urine in ccm.	aantal A.E. per 3 ccm. urine, toegevoegd aan 750 ccm. water	totale luteïdine-uitscheiding per mictie in A.E.
10	225	1,3	98
15	220	2,3	169
19	170	2,9	164
24	190	2,5	158
27	275	2,1	193
30	150	1,5	75
32	50	2,9	48
35	200	3,1	207
43	60	3	60
45	90	4,5	135
49	220	3	220
51	170	1	57
54	55	3,5	64
56	90	2,3	69
58 partus	.....	.....	.....
67	40	4	53
72	120	3	120
76	200	1,5	100
79	200	1	67
80	100	1	33
83	300	0,2	20
88	310	0,4	40
91	325	0,4	43
104	375	1,5	187
107	400	0,8	107
111	220	0,2	15
115	300	1	100
119	360	0,5	60
123	270	0	0
127	240	1,3	104
verlies	?	?	?
139	300	1	100
verlies	?	?	?
148	230	0,5	38
151	75	4,2	105
159	285	0	0
164	155	2,5	129
169	350	0	0
170	375	0,3	38
verzameld tot 200	1600	1	530
verzameld van 224—248	1200	0,5	200

Fig. 114 geeft een voorstelling van de per mictie uitgescheiden hoeveelheden luteïdine en, in spiegelbeeld, de luteïdine-concentratie.

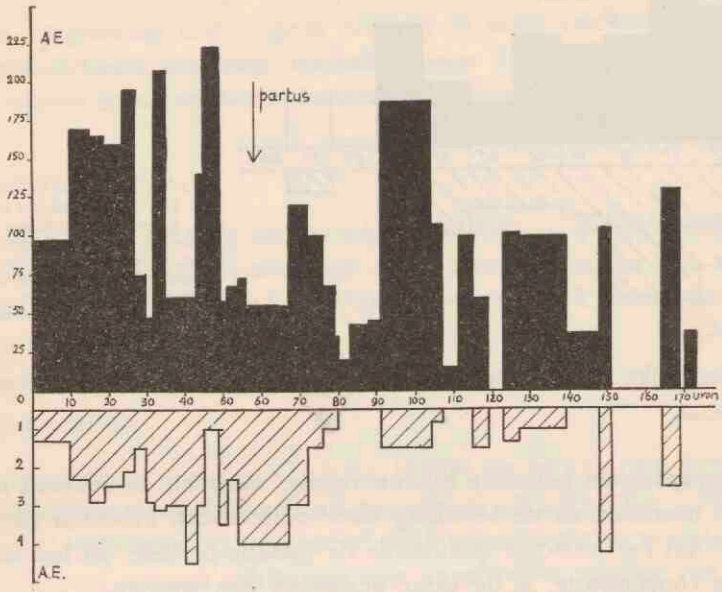


Fig. 114. De per mictie uitgescheiden hoeveelheid luteïdine bij een normale vrouw vóór, tijdens en na de partus. In spiegelbeeld de luteïdine-concentratie per 3 ccm urine.

Zoowel de luteïdine-concentratie als de totaal uitgescheiden hoeveelheid blijkt bij iedere mictie aan onregelmatige schommelingen onderhevig te zijn. Om een duidelijker overzicht over het verloop der uitscheidingskromme te verkrijgen, wordt het gemiddelde der per 24 uren verkregen waarden genomen. Dan ontstaat tabel XXVIII met bijbehoorende fig. 115.

TABEL XXVIII

Dagen	Aantal A.E. per 3 ccm.
2	2,3
1	2,9
0 (partus)	2,8
1	1,1
2	0,8
3	0,8
4	1,4
5	1
7	0,5

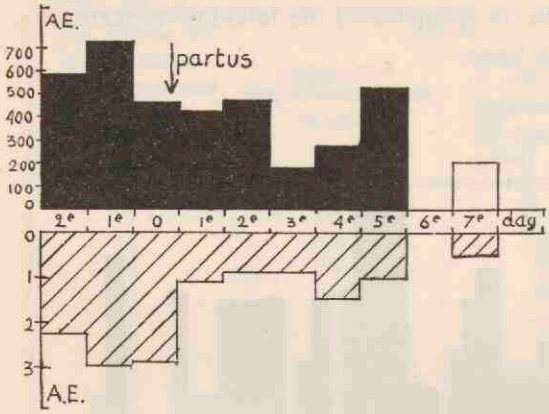


Fig. 115. De dagelijksche uitscheiden hoeveelheid luteïdine bij de onder fig. 114 genoemde vrouw, vóór, tijdens en na de partus. In spiegelbeeld de luteïdine-concentratie per 3 ccm urine. Na de partus daalt de luteïdine-uitscheiding.

Het blijkt, dat de luteïdine-concentratie na de bevalling plotseling afneemt.

Steekproeven genomen bij een vrouw, waarvan de ochtend-urine tot 6 maanden na de bevalling werd onderzocht, brachten aan het licht, dat het luteïdine gedurende de lactatie-periode, zij het in geringe concentratie, in de urine gevonden kan worden.

De volgende getallen werden bij deze vrouw gevonden.

TABEL XXIX

	Aantal A.E. per 3 ccm.
5 uur voor partus	3,2
8 uur na partus	0,3
Dagen na partus:	
1	0,6
1½	0,6
2	0,3
92	0
97	0,3
101	0
105	1,2
109	0,5
122	0
127	1,1
160	3,2
162 menstr.	

Vlak voor de eerste, na de zwangerschap optredende menstruatie is de luteïdine-concentratie in de urine blijkbaar weer gestegen.

Een vergelijking met hetgeen omtrent de mate van uitscheiding van gonadotroop hormoon, follikelhormoon en pregnaandiol vlak vóór, tijdens en na de partus bekend is leert het volgende:

Gonadotroop hormoon.

Volgens Venning en Browne (1936) is de uitscheiding van het gonadotrope hormoon op de dag van de partus niet verhoogd. Volgens Zondek (1935) is het prolan 8 dagen na de partus niet meer in de urine aan te toonen.

Follikelhormoon.

Volgens Marrian en Cohen (1935) en Marrian (1936) vermindert de totale hoeveelheid per etmaal uitgescheiden follikelhormoon (gebonden + vrije vorm) vlak voor de partus eenigszins. Tegelijkertijd ontstaat echter *een zeer aanzienlijke stijging* van het gehalte aan vrij follikelhormoon, waarschijnlijk gedeeltelijk ten gevolge van een conversie van oestriol en oestron, gedeeltelijk door overgang van het gebonden oestron en oestriol in de vrije vorm. Het is niet onwaarschijnlijk, dat deze chemische transformaties deel uitmaken van het mechanisme dat de partus inleidt. Het luteïdine wordt daarentegen vlak voor de partus in gelijke concentratie als gedurende de geheele graviditeit uitgescheiden. Volgens Zondek bevat de urine 8 dagen na de partus geen aantoonbare hoeveelheden follikelhormoon meer.

Pregnaandiol.

Volgens Venning en Browne (1937) is het pregnaandiol 24 uren na de partus practisch uit de urine verdwenen.

De luteïdine-krommen van fig. 115 en 116 vertoonen niet de, voor het follikelhormoon typische stijging vlak voor de partus. Na de partus is het luteïdine, in tegenstelling tot het gonadotrope hormoon en pregnaandiol, in de urine af en toe aantoonbaar.

5) Overzicht van de luteïdine-uitscheiding bij de vrouw.

Vereenigt men de uitscheidingskrommen voor het luteïdine, welke verkregen werden:

gedurende een normale cyclus	(zie onder 1),
gedurende de graviditeit	(zie onder 2),
voor, tijdens en na de partus	(zie onder 3),

dan ontstaat de eenigszins geschematiseerde fig. 116.

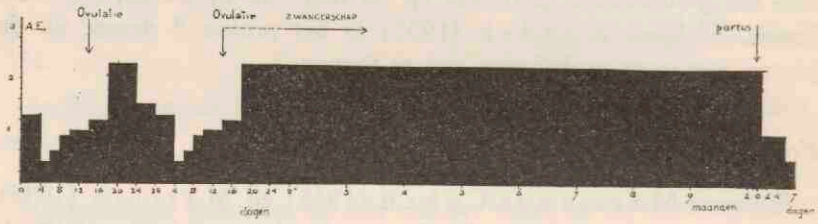


Fig. 116. Schematische figuur van de luteïdine-concentratie in 3 ccm. urine tijdens een periode van 28 dagen, een halve periode (14 dagen), de daarop volgende zwangerschap en het kraambed. Deze figuur representeert het typische verschil in uitscheiding tusschen luteïdine eenerzijds en gonadotroop hormoon, oestrogeen hormoon, pregnaandiol anderzijds.

Men ziet, dat de luteïdine-uitscheiding in de eerste periode van 28 dagen een maximum bereikt gedurende de corpus luteum-phase. Verondersteld, dat in de volgende periode bevruchting plaatsvindt, dan blijft dit maximum gedurende de geheele graviditeit bestaan, om echter na de partus weer te verdwijnen.

De luteïdine-uitscheiding blijkt duidelijk verband te houden met de sexueel-endocrine phase waarin de vrouw verkeert.

Zoolang niet bekend is wat luteïdine is, waar het geproduceerd wordt en welke werkingen het bij mensch en zoogdier heeft, is het niet mogelijk de physiologische beteekenis der besproken uitscheidingskromme te doorgronden*). Het eenige wat men zeggen kan is dat zij, vergeleken met de uitscheidingskrommen voor andere hormonen, een bijzonder karakter draagt.

*) De chemische natuur van het luteïdine en de physiologische werking, die het misschien bij het zoogdier heeft, worden onderzocht.

§ 4. DE LUTEIDINE-UITSCHEIDING IN BIJZONDERE GEVALLEN EN BIJ DEN MAN.

1) *De luteïdine-uitscheiding bij een hermaphrodite.*

Bij een typisch geval van hermaphroditisme kon de luteïdine-uitscheiding gedurende ongeveer 6 weken nagegaan worden.

De gevonden concentraties in de dagelijksche ochtendurine is in tabel XXX weergegeven.

TABEL XXX

Dagen	Aantal A.E. in 3 ccm. per 750 ccm. water	Dagen	Aantal A.E. in 3 ccm. per 750 ccm. water	Dagen	Aantal A.E. in 3 ccm. per 750 ccm. water
1	1,7	16	1,3	31	1,3
2	0,9	17	1	32	1
3	1,2	18	1	33	0,5
4	0,3	19	0,6	34	0,7
5	1,1	20	0,7	35	0,1
6	1,6	21	1,9	36	1
7	1,8	22	0,3	37	1,7
8	0,7	23	1	38	0,9
9	1	24	1,8	39	0,7
10	1,7	25	0,7	40	0,1
11	0,8	26	2,1	41	0,6
12	1,4	27	2,4	42	0,9
13	2,9	28	4,7	43	1,1
14	1,5	29	1,1	44	0,8
15	2,1	30	1,7	45	1

Fig. 117 geeft de grafische voorstelling dezer waarden weer.

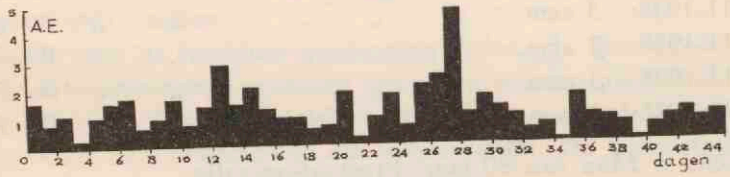


Fig. 117. De luteïdine-concentratie per 3 ccm ochtend-urine eener hermaphrodite gedurende 44 dagen. Er blijkt geen cyclische uitscheiding te bestaan.

Van een cyclische uitscheiding, zooals deze bij normaal menstrueerende vrouwen voorkomt, is in dit geval niets te bespeuren.

2) De luteïdine-uitscheiding bij vrouwelijke castraten.

In de urine van vrouwen, bij wie 4—6 weken geleden dubbelzijdige ovarectomie was verricht, kon geen luteïdine aangetoond worden. (Er werd 4 ccm urine per 750 ccm water gegeven.)

3) De luteïdine-uitscheiding bij mannen.

De dagelijksche luteïdine-uitscheiding bij mannen is nog niet over een langere periode onderzocht. Derhalve zij hier volstaan met de vermelding van het resultaat, verkregen bij enkele steekproeven, waarbij 3 ccm ochtend-urine werd toegevoegd aan 750 ccm water.

Patiënt 1. Man van 28 jaar. Appendicitis.

3-3-1936:	3 ccm.	ochtend-urine gaf een reactie van	2,8 A.E.
8-3-1936:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	1,7 A.E.

Patiënt 2. Man van 29 jaar. Beenbreuk.

27-10-1938:	3 ccm.	ochtend-urine gaf een reactie van	1,0 A.E.
28-10-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
29-10-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
30-10-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	2 A.E.
31-10-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
1-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
2-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
3-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	2,3 A.E.
4-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
5-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0,3 A.E.
6-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
7-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
8-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0,7 A.E.
9-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0,5 A.E.
10-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
11-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
12-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.
13-11-1938:	3 ccm.	„ „ „ „ „ „	0 A.E.

Patiënt 3. Man van 80 jaar. Prostaat-operatie.

6-11-1937: 3 ccm ochtend-urine gaf een reactie van 0,7 A.E.

Patiënt 4. Man van 25 jaar. Darmaandoening.

6-11-1937: 3 ccm ochtend-urine gaf een reactie van 2,9 A.E.

Uit het bovenstaande blijkt, dat het luteïdine ook voorkomt in de urine van mannen. De gemiddelde uitscheiding is bij vrouwen waarschijnlijk hooger.

4) De luteïdine-uitscheiding bij carcinoom-patiënten.

Patiënt 1. Man van middelbare leeftijd. Maag-carcinoom.
3 ccm urine gaf een reactie van 1,4 A.E.

Patiënt 2. Vrouw van middelbare leeftijd. Uterus-carcinoom.
3 ccm urine gaf een reactie van 0,3 A.E.

Uit deze oriënteerende proeven blijkt, dat de luteïdine-uitscheiding bij carcinoom-patiënten binnen normale grenzen ligt.

Samenvatting. De legbuisreactie, welke door natieve urine kan worden opgewekt is niet het gevolg van een of meer reeds bekende stoffen, doch wordt veroorzaakt door een nieuw bestanddeel (voorloopig luteïdine genoemd), dat door zijn groei- en concentratiekromme gekarakteriseerd kon worden.

Waar de productie van het luteïdine gelocaliseerd is en welke rol het in het menschelijke organisme speelt is nog onbekend.

Onderzoekt men de luteïdine-uitscheiding bij normale, niet-zwangere vrouwen, dan blijkt de uitscheidingskromme een cyclisch verloop te hebben. Het maximum valt ongeveer in het midden der corpus luteum-phase.

Tijdens de graviditeit wordt het luteïdine niet cyclisch uitgescheiden. De gemiddelde uitscheiding blijft gedurende alle maanden der graviditeit constant.

Omdat voor de luteïdine-uitscheiding tijdens de graviditeit ongeveer overeenkomstige waarden gevonden worden als tijdens de normale cyclus kan de luteïdine-uitscheiding niet als criterium gelden voor de aanwezigheid eener graviditeit. De legbuistest is dus niet geschikt als zwangerschapsreactie.

Na de partus vermindert de luteïdine-uitscheiding snel.

De luteïdine-uitscheidingskromme tijdens een normale cyclus, de graviditeit en het puerpuum draagt, vergeleken met die van het

follikelhormoon, het pregnaandiol en het gonadotrope hormoon, een geheel eigen karakter.

In de urine van vrouwelijke castraten werd geen luteïdine gevonden.

In de urine van een hermaphrodite werd het luteïdine niet cyclisch uitgescheiden.

Ook door den man wordt luteïdine uitgescheiden.

In de urine van carcinoom-patiënten kon geen abnormaal luteïdine-gehalte geconstateerd worden.

SAMENVATTING.

De legbuisgroei van het vrouwelijke bittervoorntje is een hormonale reactie, welke buiten de paaitijd kunstmatig opgewekt kan worden door toediening van bepaalde hormonen aan het aquariumwater.

Om de reacties op de verschillende soorten van hormonen nader te leeren kennen werd een testmethode uitgewerkt, waardoor de legbuisgroei, als reactie op deze verschillende hormonen, op nauwkeurige, betrouwbare en snelle wijze geregistreerd kon worden.

Met behulp van deze testmethode werd geconstateerd, dat legbuisgroei als zoodanig geen specifieke reactie is op de bij zoogdieren voorkomende oestrogene, mannelijke of progesteron-achtige hormonen. De *wijze waarop* de legbuisgroei zich voltrekt is voor deze drie groepen van stoffen echter wel specifiek. Ook voor een 27-tal onder de genoemde groepen ressorteerende steroïden bleek de wijze waarop de legbuisreactie zich voltrekt een hooge mate van specificiteit te bezitten. Hiermede was de mogelijkheid gegeven de legbuistest te gebruiken voor de qualitatieve en quantitatieve aantooning van bepaalde steroïden in organen, lichaamsvloeistoffen en urine.

Met behulp van de legbuistest kon het volgende geconstateerd worden:

1) In een waterig extract van hengsten- en stieren-testes werd een bestanddeel aangetoond, dat niet identiek is met testosteron, of een ander reeds bekend geslachtshormoon. Misschien is dit bestanddeel identiek met het hypothetische kiem-epitheel-hormoon.

2) In een waterig bijnierextract werd een bestanddeel aangetoond dat niet overeenkomt met de tot dusver uit de bijnierschors geïsoleerde steroïden. In cortine werd een ander bestanddeel gevon-

den, dat waarschijnlijk overeenkomt met het eigenlijke, nog steeds gezochte, cortex-hormoon(-complex).

3) In natief follikelvocht, corpora rubra en -lutea werd een progesteron-achtig hormoon aangetoond, dat hoogst waarschijnlijk identiek is met progesteron.

Van een aantal menschelijke corpora lutea werd het gehalte aan progesteron-achtig hormoon bepaald. Er kon een duidelijk verband gevonden worden tusschen hormoongehalte en secretorische activiteit, beoordeeld naar de pregnaandiol-uitscheiding volgens Venning en Browne.

4) Het lipoïd-extract uit de ovaria van intrauterin gestorven vruchten bleek progesteron-achtig hormoon te bevatten.

5) Placentae van mannelijke en vrouwelijke vruchten bleken een even groot gehalte aan progesteron-achtig hormoon te bevatten.

6) Het in de legbuistest werkzame bestanddeel uit urine komt niet overeen met een der reeds bekende hormonen. Dit bestanddeel, dat voorloopig luteïdine genoemd wordt, komt in de urine van mannen en vrouwen voor.

Bij normaal menstrueerende vrouwen wordt het luteïdine cyclisch uitgescheiden. Het maximum valt ongeveer in het midden der corpus luteum-phase.

Bij gravide vrouwen wordt het luteïdine niet cyclisch uitgescheiden. De gemiddelde uitscheiding blijft in alle maanden der graviditeit gelijk. Na de partus vermindert de luteïdine-uitscheiding snel.

De luteïdine-concentratie in de urine kan niet als criterium voor zwangerschap gelden. Daarom is de legbuistest geen geschikte zwangerschapsreactie.

Het bittervoorntje neemt de, bij zoogdieren voorkomende geslachtshormonen door zijn kieuwepitheel uit het omringende water op. Waarschijnlijk via de thalamus opticus werken zij in op de hypophyse voorkwab, waardoor luteïniseeringshormoon wordt afgescheiden. Dit hormoon doet uit groote eieren corpora lutea ontstaan. Deze corpora lutea scheiden een hormoon af dat de legbuis doet groeien.

In de natuur komt de legbuisgroei tot stand onder invloed van de verhoogde secretorische activiteit van de hypophyse voorkwab, waardoor het tot corpus luteum-vorming komt. Het corpus luteum-hormoon is niet identiek met progesteron of een ander bij zoogdieren voorkomend hormoon.

Bittervoorn-mannetjes kunnen een geslachtshormoon afscheiden, dat legbuisgroei veroorzaakt. Ook hierdoor kan in de paaitijd dus legbuisgroei optreden.

CONCLUSIE.

I. De legbuisgroei van het vrouwelijke bittervoorntje is specifiek voor die groep van steroïden, waartoe ook de geslachts- en bijnierschorshormonen behooren.
Door de qualitatieve en quantitatieve aantooning dezer stoffen in organen en lichaamsvochten kan de legbuistest van beteekenis zijn voor de endocrinologie van den mensch.

II. Het door mannelijke visschen afgescheiden bronsthormoon en de hormonen uit visschen-gonaden en -hypophysen, kunnen voortaan met behulp eener adaequate testmethode qualitatief en quantitatief bepaald worden. Hierdoor is de sexueele endocrinologie der koudbloedige gewervelde dieren voor exact onderzoek veel toegankelijker geworden.

ZUSAMMENFASSUNG.

Das Legeröhrenwachstum des weiblichen Bitterlings ist eine hormonale Reaktion welche ausserhalb der Laichzeit durch Zusatz bestimmter Hormone zum Aquariumwasser künstlich erzeugt werden kann.

Um die durch die verschiedenen Hormonarten erzeugten Reaktionen näher kennenzulernen, wurde eine Testmethode ausgearbeitet, womit das Legeröhrenwachstum als Reaktion auf diese verschiedenen Hormone in genauer, zuverlässiger und schneller Weise registriert werden kann.

Mit Hilfe dieser Testmethode wurde festgestellt, dass das Legeröhrenwachstum als solches keine spezifische Reaktion ist auf die bei den Säugetieren vorkommenden östrogenen, männlichen, oder progesteronartigen Hormone. Jedoch die *Weise wie* das Legeröhrenwachstum sich vollzieht ist für diese 3 Gruppen von Stoffen spezifisch. Auch für 27 zu den genannten Gruppen gehörenden Steroïde zeigt sich die Weise, worin die Legeröhrenreaktion sich vollzieht als in hohem Masse spezifisch. Hiermit war die Möglichkeit gegeben, den Legeröhrentest für qualitative und quantitative Bestimmung bestimmter Steroïde in Organen, Körperflüssigkeiten und Harn zu verwenden.

Mit Hilfe des Legeröhrentestes konnte Folgendes festgestellt werden:

1) In einem wässerigen Extrakte von Hengst- und Bullentestes wurde ein Bestandteil nachgewiesen, welcher nicht identisch ist mit Testosteron, oder einem der schon bekannten Geschlechtshormone. Vielleicht ist dieser Bestandteil identisch mit dem hypothetischen Hormon aus dem Kiemenepithel.

2) In einem wässerigen Nebennierenextrakt wurde ein Bestandteil nachgewiesen, der mit den bisher aus der Nebennierenrinde

isolierten Steroïden nicht übereinstimmt. In Cortin wurde ein anderer Bestandteil gefunden, der wahrscheinlich identisch ist mit dem eigentlichen, noch immer gesuchten Cortexhormon (-komplex).

3) In nativer Follikelflüssigkeit, in Corpora rubra und lutea wurde ein progesteronartiges Hormon nachgewiesen, welches höchstwahrscheinlich identisch ist mit Progesteron.

Von einer Anzahl menschlicher Corpora lutea wurde der Gehalt an progesteronartigem Hormon bestimmt. Es konnte eine deutliche Beziehung gefunden werden zwischen Hormongehalt und sekretorischer Aktivität, beurteilt an der Pregnandiolausscheidung laut Venning und Browne.

4) Der Lipoïdextrakt aus Ovarien intrauterin gestorbener Früchte enthielt erhebliche Menge von progesteronartigem Hormon.

5) Placentae männlicher und weiblicher Früchte wiesen einen gleichgrossen Gehalt an progesteronartigem Hormon auf.

6) Der im Legeröhrentest wirksame Bestandteil im Harn stimmt nicht überein mit einem der schon bekannten Hormone. Dieser Bestandteil, vorläufig Luteïdin genannt, kommt im Männer- und Frauenharn vor.

Bei normal menstruierenden Frauen wird das Luteïdin zyklisch ausgeschieden. Das Maximum fällt ungefähr in die Mitte der Corpus luteum-Phase.

Bei graviden Frauen wird das Luteïdin nicht zyklisch ausgeschieden. Die mittlere Ausscheidung bleibt in allen Monaten der Gravidität dieselbe. Nach dem Partus vermindert sich die Luteïdinausscheidung schnell.

Die Luteïdinkonzentration im Harn kann nicht als Kriterium für eine etwaige Schwangerschaft gelten. Deshalb ist der Legeröhrentest nicht als Schwangerschaftsreaktion brauchbar.

Der weibliche Bitterling nimmt die bei Säugetieren vorkommenden Geschlechtshormone mittels seines Kiemenepithels aus dem umgebenden Wasser auf. Wahrscheinlich via den Thalamus opticus wirken sie auf den Hypophysenvorderlappen ein, wodurch

Luteïnisierungshormon abgeschieden wird. Dieses Hormon lässt aus grossen Eiern Corpora lutea entstehen. Diese Corpora lutea sezernieren ein Hormon, das die Legeröhre wachsen lässt.

In der Natur kommt das Legeröhrenwachstum unter dem Einfluss einer erhöhten sekretorischen Aktivität des Hypophysenvorderlappens zustande, wodurch es zur Corpus luteumbildung kommt. Das Corpus luteum-hormon ist nicht identisch mit Progesteron oder einem anderen bei den Säugetieren bisher gefundenen Hormon.

Bitterlingsmännchen sind im Stande ein Geschlechtshormon abzuscheiden, das Legeröhrenwachstum verursacht. Auch hierdurch kann es in der Laichzeit zum Legeröhrenwachstum kommen.

CONCLUSION.

I. Das Legeröhrenwachstum des weiblichen Bitterlings ist spezifisch für jene Gruppe von Steroïden, wozu auch die Geschlechts- und Nebennierenrindenhormone gehören.
Durch den qualitativen und quantitativen Nachweis dieser Stoffe in Organen und Körperflüssigkeiten kann der Legeröhrentest von Bedeuting sein für die Endokrinologie des Menschen.

II. Das von männlichen Fischen sezernierte Brunsthormon und die Hormone aus Fischgonaden und -hypophysen können in Zukunft mit Hilfe einer adaequaten Testmethode qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Hierdurch ist die sexuelle Endokrinologie der kaltblütigen Wirbeltiere für exakte, experimentelle Untersuchung viel zugänglicher geworden.

SUMMARY.

The ovipositor-lengthening of the female bitterling is a hormonal reaction which can be produced artificially out of the spawning season by the addition of certain hormones to the aquariumwater.

In order to get better acquainted with the reactions, caused by the different species of hormones, a testmethod was worked out, by which the ovipositor-lengthening as a reaction on these various hormones, can be registered in an exact, reliable and quick way.

With the aid of this test-method it was observed that the ovipositor-lengthening as such is not a specific reaction on the estrogen, male or progesterone-like hormones produced by mammals. However, *the way in which* the ovipositor-lengthening becomes manifest, is specific for each of these three groups of substances. Also for about 27 steroïds belonging to the above groups the way in which the ovipositor-lengthening takes place appeared to be specific to a high degree. This observation showed the possibility of using the ovipositor-test for qualitatieve and quantitatieve demonstration of certain steroïds in organs, body-fluids and urine.

By means of the ovipositor-test the following facts have been observed:

1) In a watery extract of stallions' and bulls' testes a substance was found that is not identical with testosterone or any other sex-hormone as yet known. It may be that this substance is identical with the hypothetic germinal-epithelium-hormone.

2) In a watery adrenal extract the existence of a substance was shown that is different from the steroïds that until now have been isolated from the adrenal cortex. In cortine another component was found which probably answers to the real cortex-hormone-complex that is still searched for.

3) In native follicle-fluid, corpora rubra and corpora lutea, the existence of a progesterone-like hormone was shown that most probably is identical with progesterone.
Of a number of human corpora lutea the content of progesterone-like hormone was determined. A distinct relation was found between the hormone-content and the secretorial activity, according to the pregnandiol output after Venning and Browne.

4) The lipoïd extract from the ovaria of intrauterin died off fetuses appeared to contain progesterone-like hormone.

5) Placentae of male fetuses appeared to contain the same content of progesterone-like hormone as those of female fetuses.

6) The constituent part of the urine which is active in the ovipositor-test is not identical with any of the hormones already known. This component that is provisionally called „luteïdine", is contained in the urine of men as well as of women.

By normally menstruating women luteïdine is excreted periodically; the maximum excretion takes place in about the middle of the corpus luteum-phase.

By pregnant women luteïdine is not excreted periodically. The average excretion remains the same for all the months of the pregnancy. After the partus luteïdine excretion diminishes rapidly.

The luteïdine-concentration in the urine cannot be taken as a criterium for pregnancy. Therefore the ovipositor-test cannot be used as a means to determine pregnancy.

The bitterling takes in the sex-hormones of mammals through its gill-epithelium from the surrounding water. Probably these hormones affect via the thalamus opticus the forelobe of the pituitary by which the luteïniser is secreted.

The latter transforms large eggs, into corpora lutea and the corpora lutea secrete a hormone which makes the ovipositor grow.

In nature the ovipositor-lengthening takes place under the influence of an increased secretorial activity of the pituitary forelobe. The corpus luteum hormone is neither identical with progesterone nor with any other hormone of mammals found up to now.

Male bitterlings can secrete a sex hormone that causes ovipositor-lengthening. Therefore in the spawning season this hormone can also contribute to the ovipositor-lengthening.

CONCLUSION.

I. The ovipositor-lengthening of the female bitterling is specific for the group of steroïds, to which the sex- and the adrenal cortex-hormones also belong.
The ovipositor-test showing the qualitative and quantitative existence of these substances in organs and body-fluids, this test may be of importance for human endocrinology.

II. The rutting-hormone secreted by male fishes and the hormones from fish-gonades and fish-pituitaries, can henceforth be determined qualitatively and quantitatively by means of an adequate test-method. Consequently the sexual endocrinology of the cold-blooded vertebrates has become much more accessible for exact experimental research.

RESUMÉ.

La croissance de l'oviducte de la femelle du rhodeus amarus est une réaction hormonienne pouvant être provoquée en dehors de l'époque du frai, par l'apport d'hormones déterminées dans l'eau de l'aquarium.

Dans le but de mieux connaître les réactions provoquées par les différentes sortes d'hormones, l'auteur a élaboré une méthode-test qui permet d'enrégistrer rapidement, d'une façon minutieuse et digne de confiance, la croissance de l'oviducte, en tant que réaction à ces différentes hormones.

Cette méthode a permis de constater que la croissance de l'oviducte n'est pas, comme telle, une réaction spécifique aux hormones oestrigène, mâle ou du genre progestérone que l'on trouve chez les mammifères. La façon dont s'accomplit la croissance de l'oviducte est toutefois bien spécifique pour ces trois groupes de substances. De même, il s'est révélé que la façon dont s'accomplit la réaction de l'oviducte est grandement spécifique pour 27 stéroïdes ressortant des groupes en question. Ceci a rendu possible de se servir de l'épreuve en question pour la démonstration qualitative et quantitative de stéroïdes déterminés, dans des organes, des liquides organiques et l'urine.

L'épreuve de l'oviducte a permis de constater ce qui suit :

1. Il a été démontré, dans un extrait aqueux de testicules d'étalons et de taureaux, la présence d'un élément qui n'est identique ni à la testostérone, ni à quelle autre hormone sexuelle déjà connue. Peut-être que cet élément est identique à l'hormone hypothétique de l'épithélium germinal.

2. On a démontré dans un extrait aqueux de capsule surrénale la présence d'un élément qui n'est pas identique aux stéroïdes isolés jusqu'à ce jour de l'écorce des surrénales. On a trouvé, dans de la

cortine, un autre élément qui est vraisemblablement conforme au cortex-hormone (-complexe) que l'on cherche encore.

3. On a démontré dans du liquor folliculi, dans des corps rouges et des corps jaunes, la présence d'une hormone du genre progestérone, qui est très vraisemblablement identique à la progestérone.

Le taux d'hormone du genre progestérone d'un certain nombre de corps jaunes humains a été déterminé. On a pu constater un rapport bien net entre le taux de l'hormone et l'activité sécrétoire, en jugeant d'après la sécrétion de pregnandiol, selon Venning et Browne.

4. On a constanté que l'extrait lipoïde des ovaires de fruits morts dans l'utérus, contient une hormone du genre progestérone.

5. Les placentas de fruits mâles et femelles ont montré qu'ils contenaient une quantité semblable d'hormone du genre progestérone.

6. L'élément de l'urine, actif dans l'épreuve de l'oviducte, n'est pas en concordance avec l'une des hormones déjà connues. Cet élément, provisoirement nommé lutéïdine, se présente dans l'urine des hommes et des femmes.

Chez les femmes dont la menstruation est normale, la sécrétion de la lutéïdine est cyclique. Le maximum est placé au milieu, à peu près, de la phase du corps jaune.

La sécrétion de la lutéïdine n'est pas cyclique chez les femmes gravides. La moyenne de la sécrétion reste égale dans tous les mois de la gravidité. Après l'accouchement, elle diminue rapidement.

La concentration de la lutéïdine dans l'urine ne peut pas servir de critérium pour la gravidité. C'est pour cela que l'épreuve de l'oviducte ne peut avoir d'importance pour une réaction de gravidité.

Le gardon amer (rhodeus amarus) absorbe, de l'eau environnante, par l'épithélium de ses branchies, les hormones sexuelles présentes chez les mammifères. Ces hormones agissent vraisemblablement, par la voie du thalamus optique, sur le lobe antérieur de l'hypophyse qui sécrète l'hormone lutéïnisante. Cette hormone

cause la production des corps jaunes dans les grands oeufs. Ces corps jaunes sécrètent une hormone qui fait croître l'oviducte.

Dans la nature, la croissance de l'oviducte se produit sous l'influence d'une activité sécrétoire surélevée du lobe antérieure de l'hypophyse, ce par quoi se produit la formation de corps jaunes. L'hormone du corps jaune n'est pas identique à la progestérone ou à une autre hormone trouvée jusqu'à ce jour chez les mammifères.

Les gardons amers mâles peuvent sécréter une hormone sexuelle qui cause la croissance de l'oviducte. Ceci aussi fait qu'au temps du frai, il puisse se produire de la croissance.

CONCLUSION.

I. La croissance de l'oviducte chez la femelle du gardon amer est spécifique pour la groupe de stéroïdes auquel appartiennent aussi les hormones sexuelles et les hormones de l'écorce des surrénales.

L'épreuve de l'oviducte peut avoir de l'importance pour l'endocrinologie humaine par la démonstration qualitative et quantitative de ces substances dans les organes et les liquides organiques.

II. Dorénavant, l'hormone du rut, sécrétée par les poissons mâles et les hormones des gonades et hypophyses des poissons, peuvent être déterminées qualitativement et quantitativement à l'aide d'une méthode-test adéquate. De cette façon, l'endocrinologie des vertébrés à sang froid est devenue beaucoup plus abordable pour les recherches exactes.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR

1. ADAIR, F. L., WATTS, R. M., A study of the hormonal content of ovarian cyst fluids.
   Am. J. Obstetr. a. Gyn., **34**, 799, 1937.

2. ADAMS, A. E., MAYO, V., The gonad-stimulating potency of the pars anterior in normal and castrated newts.
   Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **35**, 227, 1936.

3. ALBRIEUX, A., BUNO, W., ENGEL, P., MORATO MANARO, J., Über die Wirkung von Progesteron auf männliche Kastraten.
   Klin. Wchschr. 206, 1936.

4. ALLBRIGHT, F., Studies on ovarian dysfunction. III The Menopause.
   Endocrinology **20**, 24, 1936.

5. ALLEN, W. M., HECKEL, G. P., Prolongation of the corpus luteum in the pseudopregnant rabbit.
   Science (N.Y.) 161, 1936 II.

6. AMMON, R., DIRSCHERL, W., Fermente, Hormone, Vitamine. 232, 1937.

7. ANDREW, R. H., FENGER, F., The isolation from ovarian tissue of a crystalline substance posessing high estrogenic properties.
   Endocrinology **20**, 563, 1936.

8. BACHMAN, C., Oestrogenic hormone and the mechanism of corpus luteum formation in the rabbit.
   Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **33**, 551, 1935-1936.

9. BARNES, B. O., KANTER, A. E., KLAWANS, A. H., Bitterling ovipositor lengthening producted by adrenal extracts.
   Science **84**, 310, 1936.

10. BAUMANN, E., SZUESZ, F., Unsere Erfahrungen über das künstliche Wachstum der Legeröhre weiblicher Bitterlinge.
    Zentrbl. f. Gyn. **95**, 1104, 1935.

11. BELL, G. H., ROBSON, J. M., The oxytocin content of the foetal pituitary.
    Quart. J. exper. Physiol. **27**, 205, 1937.

12. BENAZZI, M., Bijdrage tot de vergelijkende physiologie van de hypophyse voorkwab.
    Arch. di Sci. biol. **23**, 1, 1937.

13. BERKOWITZ, P., Effect of estrogenic substances in Lebistes reticulatus.
    Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **36**, 416, 1937.

14. BISHOP, P. M. F., HAMPSON, A. C., Studies in clinical endocrinology. I. Amenorrhoea.
    Guy's Hosp. Rep. **86**, 377, 1936.

15. BLOCH, P. W., Progestin content of blood.
Endocrinology **20**, 307, 1936.

16. BRETSCHNEIDER, L. H., DUYVENE DE WIT, J. J., Über die Hormonkette: Wirksame Harnsubstanz — Ovar — Legeröhre bei Rhodeus amarus; bewiesen durch die histologische Stufenzähl-methode.
Proc. Kon. Akad. Amsterdam **40**, 7, 2, 1937.

17. BROWNE, J. S. L., Some effects of Sex hormones on certain abnormalities of corpus luteum function.
Can. Med. Ass. J. **39**, 84, 1938.

18. BROWNE, J. S. L., HENRY, J. S., VENNING, E. H., The urinary excretion of prolan, estrin, and pregnanediol in normal pregnancy and in early and late pregnancy toxemias.
J. Clin. Investig. XVII, 4, 503, 1938.

19. —— The measurement of a pregnandiol complex in human urine.
Can. Med. Ass. J. **36**, 83, 1937.

20. BRÜHL, R., RIECKHOF, W., Weitere Bemühungen um eine beschleunigte Schwangerschaftsreaktion.
Ztschr. Geb. u. Gyn. **112**, I, 1935.

21. BURN, J. H., Biologische Auswertungsmethoden.
Julius Springer, 1937.

22. BURROWS, H., A protective action of progesterone on the genital organs of the male mice.
Nature (Lond.) 164, 1936 II.

23. BUTENANDT, A., TSCHERNING, K., Über Androsteron, ein kristallisiertes Sexualhormom. I. Isolierung und Reindarstellung aus Männerharn.
Ztschr. f. Physiol. Chem. **229**, 167, 185, 1935.

24. BUTENANDT, A., Ergebnisse und Probleme in der biochemischen Erforschung der Keimdrüsenhormone.
Naturwiss. 529, 545, 1936.

25. CALLOW, R. K., Extraction of male hormone from urine for biological assay.
Lancet 565, 1936 II.

26. CALLOW, R. K., PARKES, A.S., The occurrence of oestrin and progestin in adrenal, testis and hypophysis.
J. of Physiol. **87**, 28P, 1936.

27. —— The chemistry and assay of male hormones.
Brit. Med. J. 456, Febr. 1937.

28. CARTLAND, G. H., NELSON, J. W. The preparation and purification of extracts containing the gonad-stimulating hormone of pregnant mare serum.
J. Biol. Chem. **119**, 1937.

29. CHARIPPER, A. H., Pregnancy cells in rat pituitary: Influence of lipoidal corpus luteum extract.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **32**, I, 402, 1934-1935.

30. CLAUBERG, C., Innere Sekretion der Ovarien und der Placenta.
J. A. Barth, Leipzig, 1937.

31. COHEN, S. L., MARRIAN, G. F. WATSON, M., The excretion of oestrin during pregnancy.
Lancet I, 674, 1935.

32. COLE, H. H., HART, G. H., Concerning gonadotropic substances in mare serum.
Proc. Soc. exp. a. Med. **32 I**, 370, 1934-1935.

33. COLE, H, H.. Superfecundity in rats treated with mare gonadotropic hormone.
Am. J. Physiol. **119**, 704, 1937.

34. CORNER, G. W. ALLEN, W. M., Inhibition of menstruation by cristalline progesterone.
Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. **34**, 723, 1936.

35. CORNER, G. W., BARTELMEZ, G. W., HARTMAN, C. G., On normal and aberrant corpus luteum of the Rhesus monkey.
Am. J. Anat.. **59**, 443, 1936.

36. COURRIER, R., COHEN-SOLAL, G., Sur les rapports des hormones mâles et femelles testosterone et folliculine. Etude quantitative de leur antagonisme.
C. R. Soc. Biol. Paris **124**, 925, 1937.

37. CREASER, C. W., GORBMAN, Qu., Apparent specificity of the induced ovulation reaction in amphibia.
Am. J. Physiol. **113**, 32, 1935.

38. DANNENBAUM H., Die Wirkstoffe der männlichen Keimdrüse.
Ergebn. d. Phys. **38**, 796, 1938.

39. DEANESLEY, R., PARKES, A. S., Oestrogenic action of compounds of the androsterone-testerone series.
Brit. Med. J. **I**, 257, 1936.

40. —— Multiple activities of adrogenic compounds.
Quart. J. exper. Physiol. **26**, 392, 1937.

41. DEMPSEY, E. W., HERTZ, R., YOUNG, W. C., The experimental induction of oestrus (sexual receptivity) in the normal and ovariectomised guinea pig.
Am. J. Physiol. 204, 1936.

42. DEMPSEY, E. W., Follicular growth rate and ovulation after various experimental procedures in the guinea pig.
Am. J. Physiol. 120 (126), 1937.

43. DINGEMANSE, E., LAQUEUR, E., On the inactivation of estrone, estradiol and their monobenzoates in the organs.
Am. J. Obst. a. Gyn. **33**, 1000, 1937.

44. —— Estimation of (Capon)comb growth hormone in urine.
Biochem. J. **32/4**, 651, 1938.

45. DINGEMANSE, E., BORCHARDT, H., LAQUEUR, E. Capon comb growth promoting substances ("male hormones") in human urine of males and females of varying age.
Biochem. J. **31**, 500, 1937.

46. DORFMAN, R. I., GREULICH, W. W., SOLOMON, C. J. Excretion of androgenic and estrogenic substances in urine of children.
Endocrinology **21**, 711, 1937.

47. DRUCKREY, H., BACHMAN, H., Über die wehenauslösende Wirkung des Follikelhormons.
Zentrbl. f. Gyn. 1091, 1937.

48. DUYVENé DE WIT J. J., Biologischer Nachweis zweier neuer Hormone durch Rhodeus amarus als Eichungsobject.
Proc. Kon. Akad. Amsterdam **40**, 6, 3, 1937.

49. —— Die Reaktion des weiblichen und männlichen Bitterlings auf einige reine Sexualhormone.
Klin. Wchschr. **11**, 376, 1938.

50. —— Ein neuer Test zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Corpus luteum-Hormons.
Klin. Wchschr. **19**, 660, 1938.

51. —— Eenige resultaten verkregen bij onderzoekingen op het gebied der corpus luteum physiologie.
Tijdschr. v. Diergeneeskunde, **65/19**, 1, 1938.

52. —— Ovipositor lengthening of the female bitterling produced by administration of progesterone.
Endocrinology **24**, 580, 1939.

53. EHRENSTEIN, N., BRITTON, S. W., Further observations on cortico-adrenal extracts.
Am. J. Physiol. **116**, 42, 1936.

54. EHRHARDT, K., KÜHN, K., Über eine bisher unbekannte biologische Wirkung des weiblichen Sexualhormons.
Monatschr. f. Geburtshilfe u. Gyn. **94**, 64, 1933.

55. —— Weitere Untersuchungen über künstliches (hormonales) Wachstum der Legeröhre bei weiblichen Bitterlingen.
Zentrbl. f. Gyn. **48**, 2834, 1934.

56. EHRHARDT, K., HAGENA, A., Weitere Untersuchungen über das Corpus luteum Hormon.
Endokrinologie **17**, 51, 1936.

57. EHRHARDT, K., FISCHER-WASELS, H., Untersuchungen über den Gehalt der menschlichen Placenta an Corpus luteum Hormon.
Zentrbl. f. Gyn. 787, 1936.

58. EHRHARDT, K., FUNKE, R., Untersuchungen über die Rückwirkung des Corpus luteum Hormons auf den Hypophysenvorderlappen.
Klin. Wchschr. **45**, 1588, 1938.

59. ELDEN, C. A., Oestrin and Progestin content of the corpus luteum of the sow.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **32/I**, 1934—1935.

60. ENGELHART, E., Über eine neue Wirkung des Laktationshormons des Hypophysenvorderlappens auf Ovar und Uterus.
Klin. Wchschr. 424, 1936.

61. ENGELHART-GRAZ, E., Über den Nachweis von lutein- und oestrinartigen Wirkstoffen in der Nebennierenrinde.
Zentrbl. f. Gyn. **61**, 1098, 1937/2.

62. ESSEN-MÖLLER, E., Doppelseitige Ovarectomie im Anfange der Schwangerschaft.
Zentrbl. f. Gyn. **28**, 896, 1904.

63. EVANS, H. M., KÖRPI, K., SIMPSON, M. E., PENCHARZ, R. J., WONDER; D. H., On the separation of the interstitial cell-stimulating, luteinising and follicel stimulating fractions in the pituitary gonadotropic complex.
Univ. California Publ. Anat **I**, 255, 1936.

64. FELS, E., Etudes sur l'hormone du corps jaune.
C. r. des Séances de la Soc. de Biol. (Buenos Aires) **120**, 730, 1935.

65. —— Es el útero un órgano endócrino?
La Prenza Médica Argentina, 4 April, 1, 1938.

66. FERESTEIN, M., The corpus luteum of pregnancy in relation to the anterior pituitary gland.
Endocrinology **19**, 407, 1935.

67. FEVOLD, H. L., HISAW, F. L., GREEP, R. O., Effect of oestrin on the activity of the anterior lobe of the pituitary.
Am. J. Physiol. 114, 508, 1936.

68. —— Comparative action of gonad-stimulating hormones on the ovaries of rats.
Endocrinology **21**, 343, 1937.

69. FLATAU, S., Über Ovarectomie während der Schwangerschaft.
Arch. f. Gyn. Berlin. **82**, 452, 1907.

70. FLEISCHMANN, W., KAHN, S., Über eine Funktion des weiblichen Sexualhormons bei Fischen (Wachstum der Legeröhre des Bitterlings).
Pflüger's Arch. f. ges. Physiol. **230**, 662, 1932.

71. —— Über das Wachstum der Legeröhre des Bitterlings unter dem Einfluss des weiblichen Sexualhormons II.
Pflüger's Arch. f. ges. Physiol. **234**, 130, 1934.

72. —— Zur Frage der Spezifizität des Legeröhrentestes für Follikelhormon.
Klin. Wchschr. 644, 1935.

73. —— Wirkung des Testosterons auf das Wachstum des Kammes von Triton cristatus.
Pflüger's Arch. f. ges. Physiol. **237**, 517, 1936.

74. FLEISCHMANN, W., KAHN, S., Über das Wachstum der Legeröhre des Bitterlings unter dem Einfluss des weiblichen Sexualhormons. III. Pflüger's Arch. f. ges. Physiol. **238**, 711, 1937.

75. —— The bitterling ovipositor reaction to corticosterone. Science **87**, 2257, 305, 1938.

76. FLUHMAN, C. F., The estrin deprivation-theory of menstruation. Endocrinology **20**, 318, 1936.

77. FOSTER, M. A., CALDWELL FOSTER, R., HISAW, F. L., The interrelationship of the pituitary sex hormones in ovulation, corpus luteum formation and corpus luteum secretion in the hypophysis. Endocrinology **21**, 249, 1937.

78. FRANK, R. T., GOLDBERGER, M. A., SALMON, U. J., Estrogenic substances in the blood and urine after castration and the menopause. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **33**, 615, 1935-36.

79. FRANK, R. T., SALMON, U. J., Gonadotropic excretion in the male castrate. Effect of the male sex hormones. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **34**, 804, 1936.

80. FREED, S. C., SOSKIN, S., Complete and incomplete estrogenic hormones, arising from different sites in the rat's ovary. Endocrinology **21**, 599, 1937.

81. FREMERY, P. DE, SCHEYGROND, B., Some properties of the gonadotropic hormones of the human pituitary. Acta brev. neer. Physiol. **7**, 133, 1937.

82. FRIEDMANN, E., Sterols and related compounds. Heffer, Cambridge, 1937.

83. GALLAGHER, T. F., PETERSON , D. H., DORFMAN, R. I., KENYON, A. I., KOCH, F. C., The daily urinary excretion of estrogenic and androgenic substances by normal men and women. J. Clin. Investig. **16**, 695, 1937.

84. GALLIEN, L., Action comparée des extraits hypophysaires et des substances gonodatropes de l'urine sur l'ovulation chez Rana temporaria L. C. r. Soc. Biol. Paris, **124**, 874, 1937.

85. GERBILSKY, N. L., KASCHENKO, L. A., The effect of the hypophysis upon the gonads in Teleostei. Bull. Biol. et Méd. expér. USSR. **3**, 158, 1937.

86. GERSH, I., Glandular cells in the pars nervosa & Stalk of the hypophysis. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **37**, 395, 1937.

87. GLASER, E., HAEMPEL, O., Das experimentell hervorgerufene Hochzeitskleid des kastrierten Fisches als Stigma einer Test- und Standardisierungsmethode des männlichen Sexualhormons. Pflüger's Arch. f. ges. Physiol. **229**, 1, 1932.

88. —— Der Nachweis des männlichen Sexualhormons mit dem Fischtest. Dtsch. Med. Wchschr. **32**, 1932.

89. GLASER, E., HAEMPEL, O., Unser Fischtest als Standardisierungsmethode des männlichen Sexualhormons.
Endokrinologie, **11**, 2, 1932.

90. —— Testierung von männlichem Sexualhormon mit Fischen.
Klin. Wchschr. **38**, 1491, 1933.

91. —— Lassen sich durch die Ausscheidungen von Corpus luteum Hormon im Harn die Thesen von Ogino-Knaus von der periodischen Fruchtbarkeit bezw. Unfruchtbarkeit des Weibes bestätigen?
Klin. Wchschr. **48**, 1711, 1934.

92. —— Zur Frage der biologischen Grundlagen der periodischen Fruchtbezw. Unfruchtbarkeit der Frau.
Zentrbl. f. Gyn 702, 1936.

93. —— Über Hormonbefunde bei einer virilisierenden Ovarialgeschwulst.
Klin. Wchschr. 24, 858, 1937.

94. GLASER, E., RANFTL, F., Die Bitterlingteste auf männliche und weibliche Sexualhormone.
Klin. Wchschr. **32**, 1120, 1938.

95. GOECKE, H., Das Verhalten des männlichen Sexualhormons (Testikelhormons) im weiblichen Körper am Ende der Schwangerschaft.
Ztschr. Geb. u; Gyn. **112**, 273, 1936.

96. GRABLEY, P., Zur Indikationsstellung hormonaler Therapie.
Münch. med. Wchschr. **44**, 1741, 1937.

97. GRAEFE, M., Zur Ovariotomie in der Schwangerschaft.
Ztschr. Geb. u. Gyn. **56**, 499, 1905.

98. GRAM, L., Über die Abhängigkeit der Oestronproduktion während der Schwangerschaft von dem Geschlecht der Frucht und von der Grösse der Placenta.
Biochem. Ztschr. **289**, 397, 1937.

99. GULDBERG, E., Die Produktionsstätten der Sexualhormone im normalen graviden Organismus im Lichte der Hormonanalyse des ovariopriven graviden Zustandes.
Acta obst. et gyn. scandin. **15**, 343. 1936.

100. HAIN, A. M., The physiology of pregnancy in the rat. The combined action of male and female hormones (testosterone propionate and oestrone).
Quart. J. exper. Physiol. **26**, 294 1937.

101. HECKEL, G. P., ALLEN, W. M., The effect of oestrin and progestin on the reaction of the rabbits uterus to pituitrin in vitro.
Am. J. Physiol. **116**, 73, 1936.

102. HEROLD, L., EFFKEMANN, G., Die Bedeutung des vegetativen Nervensystems für die innersekretorische Funktion des Hypophysenvorderlappens.
Arch. f. Gyn. **167**, 389, 1938.

103. HILL, R. T., Ovaries secrete male hormones I. Restoration of the castrate type of seminal vesicle and prostate glands to normal by grafts of ovaries in mice.
Endocrinology **26**, 495, 1937.

104. HIRSCH, G. Chr. (Im Namen Duyvené de Wit und Bretschneider), Die Arbeitsphasen der Follikelzellen des Bitterlings. Der Einfluss des Ovariums auf das Auswachsen der Legeröhre.
Verhandl. Dtsch. Zool. Ges. 216, 1938.

105. HODLER, D., Surrénales et masculinisation.
Arch. d'Anat. **24**, 119, 1937.

106. HOFFMANN, Fr. Über die gonadotrope Wirkung von Nebennierenrindenextrakten.
Klin. Wchschr. 79, 1937, I.

107. —— Über die Darstellungsmethoden einer gonadotropen Substanz aus der Nebennierenrinde.
Endokrinologie **19**, 3/4, 145, 1937.

108. HOHLWEG, W., Der Mechanismus der Wirkung von gonadotropen Substanzen auf das Ovar der infantilen Ratte.
Klin. Wchschr. 1832, 1936.

109. —— Männliche Wirkstoffe und Corpus luteum-Bildung.
Klin. Wchschr. 586, 1937.

110. HOHLWEG, W., CHAMORRO, A., Über die luteinisierende Wirkung des Follikelhormons durch Beeinflussung der luteogenen Hypophysevorderlappen-Sekretion.
Klin. Wchschr. 196, 1937.

111. HOHLWEG, W., INHOFFEN, H. H., Pregneninolon, ein neues per os wirksames Corpus luteum-hormonpräparat.
Klin. Wchschr. **3**, 77, 1939.

112. HOLTZ, P., WÖLLPERT, K., Versuche zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Corpus luteum-Hormons.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 475, 1937.

113. Het Hormoon, N.V. Organon, Oss, Holland.

114. IHERING, R. v., AZEVEDO, P. DE, Über die Wirkung des Säugetier-Hypophysenhormons auf den Laichakt der Fische.
Zoöl. Anz. **120**, 71, 1937.

115. JACOBSEN, A. P., Ein experimenteller Beitrag zur Erläuterung der Beziehungen zwischen dem Corpus luteum und den gonadotropen Hormonen.
Norsk Mag. Laegevidensk. **97**, 224, 1936.

116. JASKI, C. J. Ein Oestruszyklus bei Lebistes reticulatus (Peter).
Proc. Kon. Acad. A'dam, XLII, 2, 1939.

117. —— De elevatie van Lebistes reticulatus.
Proefschrift Utrecht, 1939.

118. JONES, H. W., WEIL, P. G., The Corpus luteum Hormone in early Pregnancy.
J. Am. Med. Ass. **111**, 519, 1938.

119. KANDARATSKY, V. S., Künstliche Erzeugung von Gelbkörpern in Kaninchenovarien. Experimentelle Studien.
Zentrbl. f. Gyn. 2418, 1936.

120. KANTER, A. E., BAUER, C. P., KLAWANS, A. H., A new biologic test for hormones in pregnancy urine.
J. Am. Med. Ass. **IV**, 26, 1934.

121. —— Hormonal studies with the ovipositor lengthening reaction of the Japanese bitterling.
Am. J. Obst. a. Gyn. **31**, 764, 1936.

122. KELLER, R., Die Elektrizität in der Zelle.
Mährisch Ostrau, Kittls Nachf. 1932.

123. KIKUGAWA, MITURU, Einflüsse des Schwangerenharns auf die Süszwasserfische. I. Mitt. künstliche Verlängerung und Melanophorenreaktion des japanischen weiblichen Bitterlings.
Ztschr. Geb. u. Gyn. **116**, 91, 1937.

124. KIMURA, G. G., Amount of progestin in Corpora lutea of cows.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **33**, 97, 1935—36.

125. KLAFTEN, E., Über Bau und Funktion der durch Follikelhormon erzeugten Gelbkörper.
Ztschr. Geb. u. Gyn. **115**, 64, 1937.

126. KLEIN, M., PARKES, A. S., The progesteron-like action of testosterone and certain related compounds.
Proc. Roy. Soc. Lond. **121B**, 574, 1937.

127. KLEINER, I. S., WEISMAN, A. J., BARROWSKY, H., An investigation of the new biologic test for hormones in pregnancy urine.
J. Am. Med. Ass. 104, 1318, 1935.

128. KLEINER, I. S., WEISMAN, A. J., MISHKIND, D. I., Preparation of nontoxic urine fractions for assay of male hormone by the female bitterling test.
Science (N.Y.) 84, 2171, 142, 1936.

129. —— Use of the female bitterling as a test for male hormone.
J. Am. Med. Ass. **106**, 1643, 1936.

130. —— Relation of cholane nucleus to the female bitterlingtest for male hormone.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **34**, 367, 1936.

131. —— Effect of crystalline synthetic androsterone in the female bitterling.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **35**, 344, 1936.

132. —— The similarity of action of purified cortical adrenal extracts to crystalline androsterone and testerone.
Science (N.Y.) **86**, 159, 1937 II.

133. —— The use of the female bitterling as a test for male hormone.
Am. J. Obst. a. Gyn. **33**, 458, 1937.

134. —— The similarity of action of male hormones and adrenal extracts on the female bitterling.
Science **85**, 2194, 75, 1937.

135. KLEINER, I. S., WEISMAN, A. J., MISHKIND, D. J., COATES, C. W., The female bitterling as a biologic testanimal for male hormone.
Zoologica N.Y., Zool. Soc. **21** (4), 241, 1936.

136. KNAUS, H., Zur Physiologie des Corpus luteum.
Arch. f. Gyn. **141**, 1930.

137. KOCH, F. C., Excretion of male sex hormones in man.
Lancet, 11, 267—428.

138. KOCH, C., SCHREIBER, Br., SCHREIBER, G., Erste Ergebnisse gleichzeitiger Pfropfung zweier endokriner Organe in die Vorderkammer des Meerschweinchenauges.
Rivi. Biol. **22**, 1937.

139. KOCHAKIAN, C. D., Exkretion of male hormones I.
Endocrinology **21**, 60, 1937.

140. KORENCHEVSKY, V., Biological properties of testosterone.
Nature **137**, 494, 1936.

141a. KORENCHEVSKY, V., DENNISON, M., The histological changes in the sex organs of spayed rats induced by testosterone and oestrone.
J. of Path. **43**, 345, 1936.

141b. —— The assay of transdehydroandrosterone and its effects on male and female gonadectomized rats.
Biochem. J. **30**, 1514, 1936.

142. KORENCHEVSKY, V., DENNISON, M., ELDRIDGE, M., The prolonged treatment of castrated and ovariectomized rats with testosterone propionate.
Biochem. J. **31**, 475, 19377.

143. KORENCHEVSKY, V., DENNISON, M., HALL, K., The action of testosterone propionate on normal adult female rats.
Biochem. J. **31**, 5, 1937.

144. KORENCHEVSKY, V., HALL, K., The bisexual and co-operative properties of the sex hormones as shown by the histological investigation of the sex organs of female rats treated with these hormones.
J. of Path. and Bact. XLV, **3**, 681, 1937.

145. KRANE, W., Untersuchungen über den Einfluss der operativen Entfernung des Uterus bei der geschlechtlich reifen Frau auf die hormonale Tätigkeit des Ovars und des Hypophysenvorderlappens, zugleich eine neue Methode zur Follikulinbestimmung.
Arch. f. Gyn., **164**, 101, 1937.

146. KRAUSS, Mitteilungen über den Bitterling.
Württemb. Jahreshefte 1858.

147. KRISS, B., Feminisierende Wirkung des männlichen Sexualhormons.
Monatschr. f. Geburtshilfe u. Gyn. **106**, 157, 1937.

148. KUPFER, M., The sexual cycle of female domesticated mammals.
Un. S. Afr. Dept. Agric. Supplement to 13th & 14th Report, Director Veter. Education & Res. UU, Oct. 1928.

149. LANGE, N., Morphologisch-physiologische Untersuchungen an der Hypophyse von Fischen.
Ber. ges. Physiol. **96**, 100, 1937.

150. LANKEREN, C. V., Erzeugung der Sekretionsphase im Endometrium des Kaninchens (= Corpus luteum Hormonwirkung) durch Placentaextrakt.
Zentrbl. f. Gyn. **17**, 1000, 1936.

151. LAQUEUR, E., DINGEMANSE, E., HART, P. C., JONGH, S. E. DE, Über das Vorkommen weiblichen Sexualhormons (Menformon) im Harn von Männern (VI Mitt.)
Klin. Wchschr. **6**, 1859, 1927.

152. LEPPER, et all., Hormon content of ovarian tissue.
Lancet 5970, 1938.

153. LOEWE, S., RANDENBUSCH, W., VOSS, H. E., HEURN, W. C. v., Nachweis des Sexualhormon-Vorkommens bei Schmetterlingen.
Biochem. Ztschr. **244**, 1932.

154. MACHT, D. I., BRYAN, N. F., Antagonistic action of follicular and corpus luteum extracts on bitterlings.
Am. J. Physiol. **116**, 103, 1936.

155. MANUS, M. B. C., Wirkung von männlichen Hormonen bei Mäusen.
Acta brev. neerl. Physiol. **6**, 101, 1936.

156. MAKEPEACE, A. W., WEINSTEIN, G. L., FRIEDMAN, M. H., The effect of progestin and progesterone on ovulation in the rabbit.
Am. J. of Physiol. **119**, 512, 1937.

157. MARKUS, E., Über die Einwirkung der Sexualhormone auf die Legeröhre des Bitterlingsweibchens.
Zentrbl. f. Gyn., **33**, 1943, 1937.

158. MARLOW, H. W., GROETSEMA, F., The effect of injection of residual ovarian extract.
Endocrinology **19**, 415, 1935.

159. MARTINS, T., ROCHA, A.,
Endocrinology, **15**, 421, 1931.

160. MCGINTY, D. A., MCCULLOUGH, N. B., WOLTER, J. G., Progestin content of human placenta.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **34**, 176, 1936.

161. MCGREGOR, A. S., Abdominal pregnancy near term, operation and hormonstudies.
Am. J. Obstetr. a. Gyn. 34, 1937.

162. MIESCHER, K., WETTSTEIN, A., TSCHOPP, E., Über die Wirkungsverstärkung weiblicher Sexualhormone.
Schw. med. Wchschr. **13**, 268, 1937.

163. —— The activation of the sex hormones I and II.
Biochem. J. **30**, 11, 1970 en 1977, 1936.

164. MIESCHER, K., SCHOLZ, C., TSCHOPP, E., Activation of female sex hormones. 1. Oestrone & its esters, the output of activity & efficiency coefficient.
Biochem. J. **32**, 1, 141, 1938.

165. MIESCHER, K., Die Chemie der Nebennierenrindenhormone. Ihre Entwicklung in den letzten vier Jahren.
Angew. Chemie, **51**, 551, 1938.

166. MORATO-MANARO, J., ALBRIEUX, A. S., BUNO, W., Wirkung der Sexualhormone auf den Hahnenkamm. Versuche mit Follikulin, Progesteron und Androsteron.
Klin. Wchschr. **22**, 784, 1938.

167. MOROSOWA, T. E., Die Wirkung des Prolans und des unsterilisierten Harns Schwangerer auf die Reifung der geschlechtlichen Produkten des Barsches.
Russ. Zool. Z. 15, 1936.

168. MOSSINI, A., Die Wirkung des Schwangerenharnes auf die alkoholische Gärung und die vorgeburtliche Diagnose des Geschlechtes I und II.
Boll. Soc. ital. Biol. sper. **12**, 711, 1937.

169. MOSSMAN, H. W., The thecal gland and its relation to the reproductive cycle. A study of the cyclic changes in the ovary of the pochet gopher.
Am. J. Anat. **61**, 289, 1937.

170. MOTTA, G., Über die Genese des Corpus luteum und der Granulosa beim Weib und bei einigen Tieren.
Arch. Obstetr. 43, 181, 1936.

171. MÜHLBOCK, O., Antagonisme tusschen de werking van kamgroeistoffen eenerzijds en oestrogene stoffen resp. progesteron anderzijds.
Ned. T. v. Gen. 1937.

172. MÜLLER, H. A., Studien zum Glaser Haempel Fischtest als Nachweis des männlichen Sexualhormons und des Corpus luteum Hormons.
Arch. f. Gyn. 163, 102, 1936.

173. NELSON, J. W., GALLAGHER, T. F., Some effects of androgenic substances in the rat.
Science (N.Y.) II, 230, 1936.

174. NOLL, F. C., Bitterling und Malermuschel. I und II.
Der Zool. Garten 10, 257, 1869, en 11, 131, 1870.

175. —— Gewohnheiten und Eierlegen des Bitterlings.
Der Zool. Garten 18, 1877.

176. ODELL, A. D., MARRIAN, G. F., A note on the presence in human pregnancy urine of an acid-hydrolysable combined form of pregnandiol. Biochem. J. **30**, 1533, 1936.

177. OWEN, S. E., The reaction of fish to sex hormons. Endocrinology, **20**, 214, 1936.

178. PALMER, A., Hormones in urine of a normal non-pregnant woman. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **37**, 273, 1937—'38.

179. PARKES, A. S., The use of bantam capons for the assay of male hormone preparations. Quart. J. Pharmacy a. Pharmacology 9, 669, 1936.

180. —— Relative duration of action of various esters of oestrone, oestradiol and oestriol. Biochem. J. **31**, 4, 579, 1937.

181. —— Androgenic activity of ovarian extracts. Nature, **139**, 965, 1937.

182. —— Source of androgenic and oestrogenic substances of the urine. Lancet 902, 1937.

183. —— Terminology of sex hormones. Nature **141**, 36, 1938.

184. PARKES, A. S., ROWLANDS, I. W., Inhibition of ovulation in the rabbit by anti-gonadotropic serum. J. of Physiol. **87**, 17, 1936.

185. —— A study of anti-thyrotropic activity. Proc. Roy. Soc. Lond. B, 817, **120**, 114, 1936.

186. —— The effect of anti-gonadotropic serum on the reproductive organs of the normal animal. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 824, **121**, 517, 1937.

187. —— Pro-gonadotropic sera. The specificity of antigonadotropic sera. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 837, **124**, 492-521, 1938.

188. —— Inhibition of the gonadotropic activity of the human pituitary by antiserum. Lancet, 924, 1937.

189. —— Ineffectiveness in Birds of antisera for mammalian gonadotropic and thyrotropic substances. J. of Physiol. **90**, 1, 100, 1937.

191. PARKES, A. S., ZUCKERMAN, S., Experimental hyperplasie of the prostate. Lancet, 925, 1935.

190. PARKES, A. S., SELYE, H., Adrenalectomy of Birds. J. of Physiol. **86**, 1, 1936.

192. PEDERSEN, G., BJERGAARD, K., Titrierung von Oestrin und gonadotropem Hormon im Harn. Zentrbl. f. Gyn. **60**, 372, 1936.

193. PINCUS, G., ENZMAN, E. V., The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit.
J. of Morph. **61**, 351, 1937.

194. POLICARD, A., FERRAND, M., La teneur en acide ascorbique de l'ovaire et du corps jaune suivant les divers.
C. r. Soc. Biol. Paris **122**, 200, 1936.

195. PRATT, J. P., The human corpus luteum and progestine.
Endocrinology **18**, 6, 667, 1934.

196. —— The human corpus luteum.
Arch. of Path. **19**, 380, 545, 1935.

197. PRATT, J. P. ALLEN, E., Newell, Q. U., BLAND, L. J., Human ova from the uterine tubes.
J. Am. Med. Ass. **93**, 834, 1929.

198. PRATT, J. P., HAMBLEN, E. C., KAMM, O., MCGINTY, D. A., The human corpus luteum and progestin. Studies II.
Endocrinology **20**, 6, 741, 1936.

199. PROBSTNER, A., Hormonuntersuchung in corpus luteum-cysten.
Endokrinologie **16**, 174, 1936.

200. PUECH, P., VANVERTS, J., Du rôle du corps jaune dans la nidation et le développement de l'oeuf chez la femme.
Bull. Soc. d'Obst. et de Gyn. de Paris **II**, 456, 1913.

201. REICHSTEIN, T., LAQUEUR, E., UYLDERT, J. E., FREMERY, P. DE, SPANHOFF, R. W., Eine wirksame kristallinische Substanz aus der Rinde der Nebenniere, Corticosteron.
Proc. Kon. Akad. A'dam **39**, 1218, 1936.

202. REMESOV, J., Dependance of the biological effect of sexual hormones on their chemical structure.
J. Biochem. **24**, 113, 1936.

203. REUSCH, J., Frühstadien der Corpus luteum Bildung beim Menschen.
Arch. f. Gyn. **85**, 105, 1916.

204. REYNOLDS, S. R. M., FIROR, W. M., ALLEN, W. M., Relative effectiveness of progestin in hypophysectomised and normal rabbits.
Endodcrinology **20**, 681, 1936.

205. RIES, E., WETZEL, K, Probleme der Biologie. I. Bnd. Hormone bei wirbellosen Tieren.
Akad. Verl. M. B. H. Leipzig.

206. ROBSON, J. M.. Maintenance of the ovarian and luteal functions and of pregnancy in the hypophysectomised rabbit.
J. of Physiol. **87**, 75, 1936.

207. —— The action of progesterone on the uterine of the rabbit and its antagonism by oestrone.
J. of Physiol. **88**, 100, 1936.

208. —— The role of the luteal hormone in the maintenance of gestation.
Edinburgh Med. J. N.S. **43**, 395, 1936.

209. ROBSON, J. M., Reactions of the uterine muscle and endometrium of the rabbit to testosterone.
Quart. J. exp. Biol. **26**, 355, 1937.

210 RÖSSLE, R., ZAHLER, H., Experimentelle Untersuchungen über Hoden- und Prostataveränderungen durch Zufuhr von Hodenwirkstoffen.
Virchow's Arch. f. path. Anat. u. Physiol. u. f. Klin. Med. **302**, 251, 1938.

211. RÚGE, C., Über Ovulation, Corpus luteum und Menstruation.
Arch. f. Gyn. **100**, 20, 1913.

212. RUGH, R., Pituitary induced sexual reactions in the anura.
Biol. Bull. **68**, 74, 1935.

213. RUZICKA, L., GOLDBERG, M. W., ROSENBERG, H. R., Sexual-hormone X. Herstellung des 17-methyl-testosterons und anderer Androsten- und Androstanderivate.
Helv. Chem. Acta **18**, 1487, 1935.

214. RUZICKA, L., STEPP, E., MELLANBY, E., Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung. Bnd. 1 und 2.
Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig, 1938-1939.

215. RUZICKA, L., TSCHOPP, E., Über die künstliche Herstellung und die physiologischen Wirkungen des männlichen Sexualhormons.
Schw. med. Wschr. 1118, 1934.

216. RUZICSKA, G., Chorioepitheliom und mola hydatidosa vom Gesichtspunkte der quantitatieven Hormonbestimmung.
Orv. Hetil. 310, 340, 1936.

217. SALA, S. L., LASCANO GOUZALEZ, J. M., Über die Geschlechtsprognose vor der Geburt durch Untersuchung der männlichen foetalen Hormone.
Arch. med. Hosp. Ramos Mejia **18**, 154, 1936.

218. SCHACHTER, B., MARRIAN, G. F., Observations on the conjugated oestrogens in the urine of pregnant mares.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **35**, 222, 1936.

219. SCHLOSSBERG, T., DURRUTY, C. A., L'activité oestrogène du sang.
C. r. Biol. Paris 123, 70, 1936.

220. SCHMIDT, I. G., The effects of hypophysical implants from normal mature guinea pigs on the sex organs of immature pigs.
Endocrinology **21**, 1937.

221. SCHMIDT-THOMé J., Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet oestrogener Wirkstoffe (Follikelhormone).
Ergebn. d. Phys. **39**, 192, 1937.

222. SCHOELLER, W., DOHRN, M., HOHLWEG, W., Die Überlegenheit des weiblichen Hormons in seiner Wirkung auf die männlichen und weiblichen Kastratenhypophysen gegenüber männlichen Hormonen.
Klin. Wschr. 1907, 1936 II.

223. SCHOELLER, W., GEHRKE, M., Tierphysiologische Versuche über die Wirkung männlicher Keimdrüsenhormone I. Versuche an Kapaunen.
Klin. Wchschr. **20**, 694, 1938.

224. SCHÖNER, O., Geschlechtsbestimmungen beim Menschen.
Wien. med. Wchschr. **744**, 1935.

225. SEIFERLE, E., Die sogenannten interstitiellen Zellen des Eeierstockes und ihre Beziehungen zu Stroma und Ovariaecyclus im besonderen beim Schwein.
Z. Zellforsch. **25**, 421, 1936.

226. SHAPIRO, H. A., ZWARENSTEIN, H., A test for the early diagnosis of pregnancy on the South African Clawed toad. (Xenopus Laevis).
S. Afr. Med. J. **9**, 202, 1935.

227. SMITH, G. V. S., KENNARD, J. H., Progestin and estrin of 19 placentas from normal and toxemic cases.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **36**, 508, 1937.

228. SMITH, G. V. S., SMITH, O. W. PINCUS, G., Total urinary estrogen, estrone and estriol during a menstrual cycle and a pregnancy.
Am. J. Physiol. **121**, 98, 1937.

229. SOKOLOF, E., L'ablation du corps jaune au début de grossesse, expose-'t-elle a l'avortement?
Thesis Pris, **202**, 1913.

230. SORGE, H., Anatomische Untersuchungen am Bitterling.
Sitz. Ber. Ges. Naturfr. Berlin, 8, 1932.

231. SPOTO, P., Die quantitative Untersuchung der Ausscheidung der gonadotropen Substanzen im Schwangerenharn bei der Beurteilung physiopathologischer Erscheinungen der weiblichen Sexualtätigkeit.
Ginecologia (Torino) **2**, 553, 645, 1936.

232. STEIN, K. F., Effects of Avian Pituitary glands in Salamanders.
Proc. Soc. exper. Biol. a. med. **32 I**, 157, 1934-35.

233. STIASNY, A. G. Schwangerschaftsnachweis an Bitterlingen.
Dtsche Med. Wchschr. **40**, 1534, 1937.

234. STIASNY, H., Schwangerschaftsnachweis bei Mensch und Tier durch das Wachsen der Legeröhre weiblicher Bitterlinge.
Ztschr. Geb. u. Gyn. **116**, 108, 1937.

235. SWEZY, O., Hormones and evolution.
Amer. Naturalist **70**, 498, 1936.

236. Symposia on quantitative biology. Biological Laboratory, Cold Spring Harbor.
Vol. V, 1937.

237. SZüSZ, F., Researches conducted with Rhodeus amarus for determination of early pregnancy.
Orvorsi Hetil. **77**, 905, 1933.

238. SZÜSZ, F., Untersuchungen mit Bitterlingen zur Erkennung der Schwangerschaft.
Monatschr. f. Geburtshilfe u. Gyn. **96**, 292, 1934.
Tabulae Biologicae, **15**, I, 1938.

239. TAKATA, M., DOHMOTO, M., Gehalte van het bloed aan follikelhormoon bij normaal menstrueerende vrouwen.
Tohoku J., exp. Med. **80**, 220, 1937.

240. TAKEWAKI, K., Notes on adrenal cortex of pregnant mice.
J. Fac. Sci. Univ. Tokyo **4**, 4, 277, 1936.

241. TANG-SII, Über die Funktion der Zwischenzellen des Hodens.
Tung-Chi Kongr. H. 117, 1936.

242. THEOBALD, G. W., A centre or centres in the hypothalamus controlling menstruation, ovulation, pregnancy and parturition.
Brit. Med. J. **1**, 1038, 1936.

243. TOZAWA, T., Experiments on the development of the nuptial coloration and pearl organs of the Japanese bitterling.
Folia anat. Japon. **7**, 407, 1929.

244. TRETTENERO, M., Over de verhouding tusschen de concentraties van de zwangerschapshormonen in de urine en in het bloed.
Ateneo parm. **2**, 8, 1936.

245. TSCHOPP, E., Die physiologischen Wirkungen des künstlichen männlichen Sexualhormons (Androsteron).
Klin. Wchschr. 1064, 1935.

246. VENNING, E. H., Gravimetric method for the determination of soium pregnandiol glucuronidate.
J. Biol. Chem. **119**, 2, 1937.

247. —— Further studies on the estimation of small amounts of sodium pregnanediol glucuronidate in urine.
J. Biol. Chem. 1926, 2, 1938.

248. VENNING, E. M., BROWNE, J. S. L., Isolation of a water-soluble Pregnandiol complex from human pregnancy urine.
Proc. Soc. exper. Viol. a. Med. **34**, 792, 1936.

249. —— The assay of urinary oestrin and gonadotropic substances during pregnancy.
Am. J. Physiol. **116**, 1, 18, 1936.

250. —— Excretion of gonadotropic substances in urine during pregnancy.
Lancet, 1507, 1936.

251. —— Urinary excretion of sodium pregnandiol glucuronidate in the human menstrual cycle.
Am. J. Physiol. **119**, 2, 417, 1937

252. —— Studies on corpus luteum function. Endocrinology **21**, 6, 711, 1937.

253. VENNING, E. M., BROWNE, J. S. L., A study of the metabolism of progesterone.
Am. J. Physiol. **123**, 1, 26 en 209, 1938.

254. WEISMANN, A. I., COATES, C. W., MOSES, R. L., An investigation of the presence of estrogenic hormones in the ova and ovaries of fish.
Endocrinology **20**, 561, 1936.

255. WEISMANN, A. I., MISHKIND, D. I., KLEINER, I. S., COATES, C. W., Estrogenic Hormones in the ovaries of swordfish.
Endocrinology **21**, 413, 1937.

256. WESTMAN, A., JACOBSOHN, D., Über Oestrinwirkungen auf die Corpus luteum Funktion. 1. und 2. Mitteilung.
Acta obstet, et gyn. Scand. **17**, 1 u, 13 u, 235, 1937.

257. WESTPHAL, U., Über das Hormon des Corpus luteum.
Ergebn. d. Phys. **37**, 1935.

258. WIESBADER, H., ENGLE, E. T., SMITH, P. E., Menstrual bleeding after corpus luteum excision followed by oestrin or progestin therapy.
Am. J. Obstet. a. Gyn. **32**, 1039, 1936.

259. WINTER, K. A., REISS, M., BALINT, J., Nebennierenrinde und Luteinisierung.
Klin. Wchschr. **13**, 4, 146, 1934.

260. WOERD, L. A. VAN DER, JONGH, S. E. DE, Über den Einfluss des Testosterons und des Dehydroandrosterons auf die paradoxe Menformonwirkung.
Acta brev. neerl. Physiol. 6, 88, 1936.

261. WOLFE, J. M., CHADWICK, C. S., Quantitavie studies on the structural changes induced in the anterior hypophysis by injections of oestrin.
Endocrinology **20**, 503, 1936.

262. WOLFE, J. M., Comparative action of injections of oestrin and a combination of oestrin and anterior pituitary-like substances on the anterior hypophysis.
Anat. Record. **68**, 2, 1937.

263. WOLFE, J. M., HAMILTON, J. B., Comparative action of testosterone compounds of estrone and of combinations of testosterone compounds and oestrone on the anterior hypophysis.
Endocrinology **21**, 603, 1937.

264. WUNDER, W., Beeinflussung der sekundären Geschlechtsmerkmale des Bitterlings durch Hormone und andere Reize.
Mediz. Klinik **26**, 874, 1934.

265. YOUNG, L. E., Comparisan of the Corner-Allen and Clauberg Tests for assay of progestin.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **34**, 96, 1936.

266. ZONDEK, B., Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens.
2e Aufl., Julius Springer, 1935.

267. —— Impairment of anterior pituitary functions by follicle-hormone.
Lancet, 842, 1936 II.

268. ZONDEK, B., Hemmung der Menstruation durch Follikelhormon.
Wien. Klin. Wchschr. 455, 1936 I.

269. —— The effect of artificial pseudomenstruation and menstruation on the increased elimination of prolan A in the absence of ovarian function.
Am. J. Obstetr. a. Gyn. **33**, 1, 96, 1937.

270. —— The effect of long-continued large doses of follicle-hormone upon the uterus of the rat.
Am. J. Obstetr. a. Gyn. **33**, 6, 979, 1937.

271. —— Menstruation-like haemorrhage in rabbits induced by gonadotropic hormone.
J. Obstetr. a. Gyn. of the Brit. Empire **45**, 1, 1, 1938.

272. —— Cutaneous application of follicular hormone.
Lancet, 1107, 1938.

273. —— Hypophyseal tumors induced by estrogenic hormone.
Am. J. of Cancer, **32**, 4, 1938.

274. ZONDEK, B., BERGMANN, E., Phenol methyl ethers as oestrogenic agents.
Biochem. J. **32**, 4, 641, 1938.

275. ZONDEK, B., KROHN, H., Hormon des Zwischenlappens der Hypophyse.
Klin. Wchschr. **10**, 405, 1932.

276. ZUCKERMAN, S., The menstrual cycle of the primates XII.
Proc. Roy. Soc. Lond. **124**, 150, 1937.

277. ZWARENSTEIN, H., Gonadotropic activity of amphibian anterior pituitary.
Nature (Lond.) 588, 1937, II.

278. —— Induction of Ovulation with Progesterone.
Nature **139**, 112, 1937.

STELLINGEN.

I.

Door:

a) de recente ontdekking van het voorkomen van geslachtshormoon bij visschen (J a s k i),

b) de analyse der sexueel-endocrine organisatie van Rhodeus amarus (B r e t s c h n e i d e r),

c) de legbuistest als adaequate testmethode,

is de sexueele endocrinologie der koudbloedige gewervelde dieren voor exact experimenteel onderzoek veel toegankelijker geworden.

II.

De bewering van G l a s e r c.s., dat het mannelijke bittervoorntje geschikt is voor de qualitatieve en quantitatieve aantooning van:

a) natuurlijk voorkomend mannelijk hormoon,

b) het corpus luteum-hormoon (progesteron),

is onjuist.

GLASER c.s.,
Pfl. Arch. 299, 1931;
Kl. Wschr. **12**, 1933.

III.

Het bij Rhodeus amarus voorkomende corpus luteum-hormoon (oviductine) is niet identiek met het bij zoogdieren voorkomende corpus luteum-hormoon (progesteron).

IV.

De opvatting van K a n t e r, dat de legbuistest geschikt is voor de aantooning van zwangerschap is onjuist gebleken.

KANTER c.s.,
J. am. med. Ass. **26**, IV,
1934.

V.

Met behulp van de zgn. capillair-methode van P f e f f e r is het niet mogelijk te onderzoeken of varen-spermatozoïden, gebracht in appelzuur-oplossingen van verschillende concentraties, gehoorzamen aan de wet van W e b e r-F e c h n e r.

PFEFFER,
Pflanzenphysiologie,
2, 809, 1904.

VI.

Volgens Kramer is het ontstaan van zgn. brandplekken op bladeren, na besproeiïng in de volle zon, niet het gevolg eener overmatige plaatselijke verwarming. De proefnemingen, waarop Kramer zijn meening baseert wettigen deze conclusie niet.

KRAMER,
Am. J. of Bot. 1, 12, 1939.

VII.

De meening van Harrar, dat infectie van Hevea-soorten door Fomes lignosus niet door verandering van de zuurgraad van de bodem bestreden kan worden is aanvechtbaar en blijkt ook niet uit zijn desbetreffende proefnemingen.

HARRAR,
Univ. of Minnes. Agric.
Exp. Stat., Techn. Bull. 123,
1937.

VIII.

Het verdient aanbeveling te onderzoeken, of het principe, dat aan de gezwel-theorie van Kögl-Erxleben ten grondslag ligt, ook van toepassing is op het virus-probleem.

KÖGL-ERXLEBEN,
Kon. Ned. Akad. Wet.
XXXVIII, No. 1, 1939.

IX.

De zgn. grenshorizon is geen klimatologische, doch een edaphische vorming.

WASSINK,
Med. bot. Mus. en Herb.
Rijksuniv. Utrecht, No. 64,
1939.

X.

Het vermogen van de mensch de materie te beheerschen is grooter dan zijn zedelijke kracht hiervan het juiste gebruik te maken.

TABEL III

No. visch	REEKS A 1e toediening 3 ccm urine A			REEKS B 2e toediening 3 ccm urine A			REEKS C 3e toediening 3 ccm urine A			REEKS D 4e toediening 3 ccm urine A			REEKS E 5e toediening 3 ccm urine B			REEKS F 6e toediening 3 ccm urine A			REEKS G 7e toediening 3 ccm urine A			REEKS H 8e toediening 3 ccm urine A		
	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.	begin-lengte	eind-lengte	toename in A.E.
1	1	5	4	2	7	5	2	8	6	3	7	4	3	3	0	2	6	4	4	5	1	0	1	1
2	0	2	2	2	8	6	3	8	5	4	8	4	6	4	—2	4	8	4	6	8	2	1	2	1
3	3	6	3	3	7	4	3	7	4	4	9	5	6	5	—1	5	9	4	6	10	4	1	4	3
4	1	6	5	2	6	4	2	5	3	2	8	6	5	4	—1	2	7	5	6	8	2	1	3	2
5	2	6	4	2	7	5	2	7	5	1	3	2	2	2	0	2	6	4	6	7	1	1	1	0
6	0	2	2	2	8	6	2	8	6	2	8	6	6	4	—2	3	7	4	6	9	3	2	3	1
7	1	6	5	3	7	4	5	7	2	4	8	4	6	6	0	4	7	3	6	6	0	1	3	2
8	0	1	1	1	5	4	2	5	3	1	6	5	2	2	0	1	7	6	3	7	4	0	1	1
9	2	4	2	2	6	4	3	7	4	1	9	8	3	3	0	3	7	4	6	12	6	3	5	2
10	0	1	1	1	6	5	3	6	3	2	7	5	2	2	0	2	7	5	6	9	3	(2)	—	—
11	1	2	1	2	6	4	3	7	4	1	7	6	2	2	0	2	6	4	5	9	4	(1)	—	—
12	1	3	2	2	5	3	1	6	5	4	5	1	2	2	0	2	7	5	5	7	2	2	3	1
	12	44	32	24	78	54	31	81	50	29	85	56	45	39	—	32	84	52	65	97	32	12	26	14
	gemiddelde toename 2,7 A.E.			idem 4,50 A.E.			idem 4,17 A.E.			idem 4,67 A.E.			idem 0 A.E.			idem 4,33 A.E.			idem 2,67 A.E.			idem 1,4 A.E.		

TABEL VII

	NAAM VAN DE STOF	GROEIKROMMEN				IJKINGSKROMMEN			
		latentie-tijd in uren	lineaire groei in uren			knik bij ... γ	1e phase	2e phase	stijging
			1e phase	2e phase	stijging				
1	progesteron	1	$3^1/_2$	—	+	9 γ	3,9 A.E.	— A.E.	+
2	allo-pregnaandion	1	3	—	±	12 „	4,3 „ „	— „ „	+
3	allo-pregnanolon	1	4	—	?	75 „	4,4 „ „	— „ „	—
4	allo-pregnaandiol	2	6	—	±	225 „	3,2 „ „	— „ „	+
5	△-5,6-pregneendion	$1^1/_2$	3	—	—	45 „	4,5 „ „	— „ „	—
6	△-5,6-pregnenolon	$2^1/_2$	5	—	?	75 „	3,6 „ „	— „ „	+
7	pregnaandion	$1^1/_2$	$3^1/_2$	—	±	75 „	3,4 „ „	— „ „	+
8	pregnanolon	$1^1/_2$	5	—	±	— „	— „ „	— „ „	?
9	pregnaandiol	1	$4^1/_2$	$4^1/_2$	—	— „	— „ „	— „ „	?
10	corticosteron	1	$3^1/_2$	—	—	450 „	3 „ „	— „ „	?
11	desoxycorticosteron	1	$3^1/_2$	—	—	5 „	2,9 „ „	— „ „	+
12	desoxycorticosteron-acetaat	1	3	—	±	3 „	3,7 „ „	— „ „	—
13	△-4,5-androsteendion	1	$4^1/_2$	$4^1/_2$	—	$\frac{8}{16}$ mg	0,9 „ „	3,1 „ „	+
14	trans-testosteron	2	$3^1/_2$	$4^1/_2$	—	$\frac{5}{16}$ „	0,7 „ „	2,9 „ „	+
15	trans-dehydro-androsteron	1	$4^1/_2$	$6^1/_2$	+	$\frac{12}{16}$ „	1,3 „ „	3,5 „ „	—
16	△-5,6-androsteendiol	1	$4^1/_2$	$6^1/_2$	+	40 γ	1,1 „ „	3,1 „ „	—
17	androstaandion	1	$4^1/_2$	$6^1/_2$	+	$\frac{2}{16}$ mg	0,8 „ „	2,0 „ „	—
18	cis-androsteron	1	$4^1/_2$	$5^1/_2$	—	$\frac{4}{16}$ „	0,8 „ „	1,8 „ „	+
19	trans-androsteron	1	$4^1/_2$	$6^1/_2$	+	$\frac{4}{16}$ „	0,2 „ „	1,2 „ „	—
20	cis-dihydro-testosteron	1	$4^1/_2$	$4^1/_2$	—	$\frac{5}{16}$ „	0,8 „ „	2,4 „ „	—
21	trans-dihydro-testosteron	1	$4^1/_2$	$6^1/_2$	+	$\frac{5}{16}$ „	0,5 „ „	1,8 „ „	—
22	androstaandiol	1	$4^1/_2$	$4^1/_2$	—	$\frac{4}{16}$ „	0,7 „ „	2,3 „ „	+
23	methyl-testosteron	1	$4^1/_2$	$4^1/_2$	—	$\frac{4}{16}$ „	—	2,2 „ „	+
24	testosteron-propionaat	1	$4^1/_2$	—	—	$\frac{10}{16}$ „	2,3 „ „	— „ „	+
25	oestron	$5^1/_2$	—	54	—	20 γ	— „ „	3,4 „ „	+
26	oestradiol	$5^1/_2$	—	54	—	25 „	— „ „	4,2 „ „	—
27	oestriol	$5^1/_2$	—	42	—	30 „	— „ „	4,2 „ „	—