

**TESTOSTERON:
ANDROGEEN EN OESTROGEEN**

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS PROF. DR B. LEIJNSE
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP
WOENSDAG 25 JANUARI 1978
DES NAMIDDAGS TE 3.00 UUR

DOOR

JOHANNES THEORODUS MARIA VREEBURG

GEBOREN TE LEIDEN

PROMOTOR : PROF. DR J.J. VAN DER WERFF TEN BOSCH

CO-REFERENTEN : PROF. DR M.W. VAN HOF

PROF. DR H.J. VAN DER MOLEN

Drukkerij : Stout, Vlaardingen
Typografie : Anneke Bot en Sandra Vreeburg-Hoogeboom
Illustraties : Dick Simons
Omslag : Vladi Nykl en Dick Simons

INHOUD

	blz.
HOOFDSTUK 1	PRODUKTIE, EFFECTEN EN WERKINGS- WIJZE VAN TESTOSTERON
1.1.	<i>De produktie van testosteron door de testikel</i> 1
1.2.	<i>Enkele effecten van testosteron</i> 3
1.3.	<i>Werkingswijze van testosteron</i> 6
1.3.1.	<i>Het receptormodel</i>
1.3.2.	<i>Het metabolisme van testo- steron in androgeengevoe- lige weefsels</i>
1.4.	<i>Vraagstelling</i> 10
HOOFDSTUK 2	DE EPIDIDYMIS
2.1.	<i>Inleiding</i> 11
2.2.	<i>De rijping van spermatozoën</i> 12
2.3.	<i>Opslag van spermatozoën</i> 15
2.4.	<i>Het milieu in de epididymis</i> 16
2.5.	<i>Enkele effecten van testosteron op de epididymis</i> 19
2.6.	<i>Samenvatting</i> 20
HOOFDSTUK 3	DE CONCENTRATIE VAN TESTOSTERON EN DIHYDROTESTOSTERON IN DE EPIDIDYMIS VAN DE RAT
3.1.	<i>Inleiding</i> 21
3.2.	<i>De produktie van testosteron door de testikel en de dihydrotestoste- ronconcentratie in de epididymis</i> 23

3.3. <i>De aanvoer van androgenen via de ductuli efferentes van de testikel en de androgeenconcentratie in de epididymis</i>	26
3.4. <i>De lokalisering van dihydrotestosteron en testosteron in de epididymis</i>	33
3.5. <i>De concentratie van dihydrotestosteron en de aanwezigheid van androgeenbindende transport-eiwitten in de epididymis</i>	38
3.6. <i>Samenvatting</i>	40

HOOFDSTUK 4 DE REGULATIE VAN DE EPIDIDYMIS-FUNCTIE DOOR ANDROGENEN

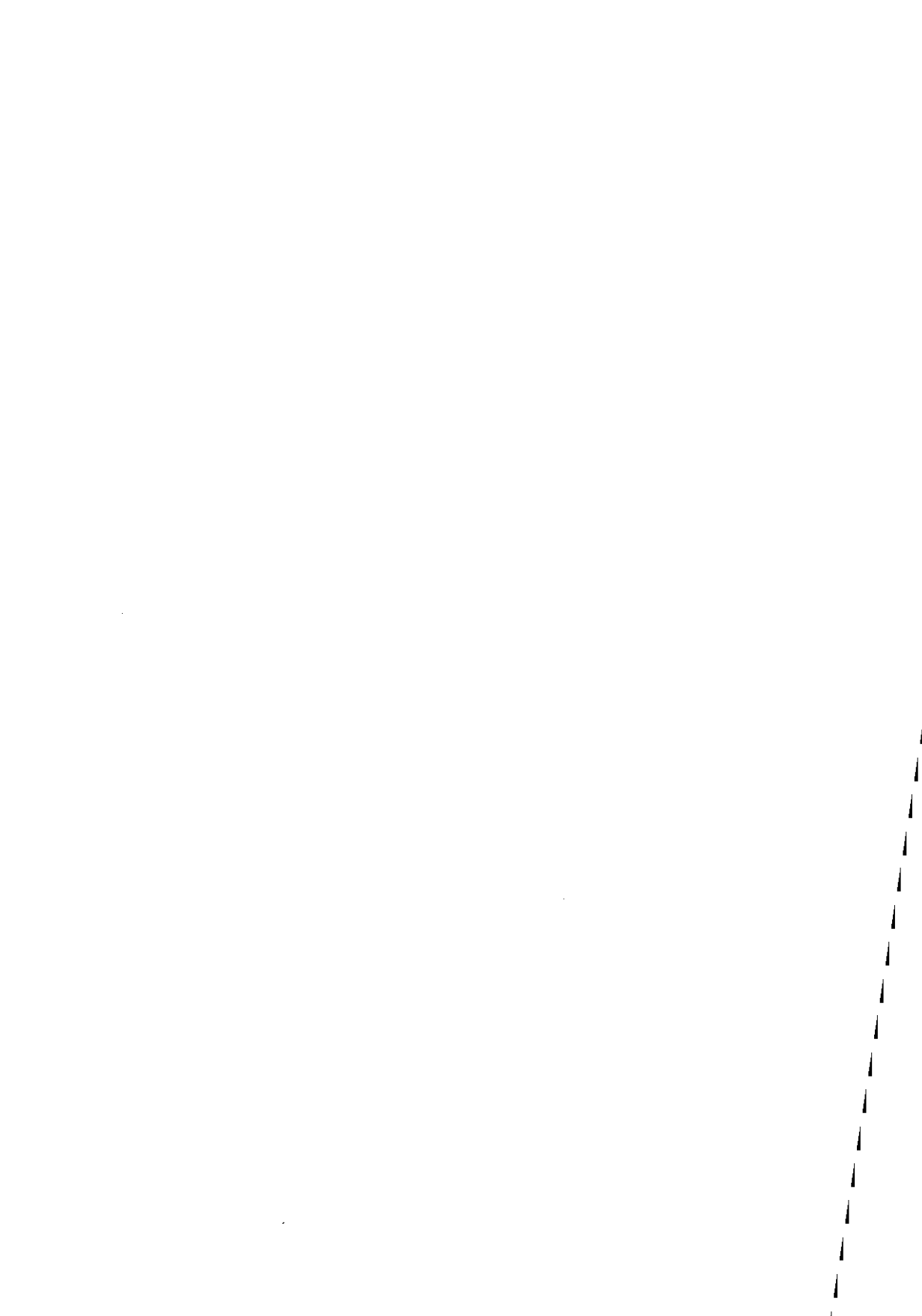
4.1. <i>Inleiding</i>	41
4.2. <i>Het testosteronmetabolisme in de epididymis</i>	41
4.3. <i>Effecten van testosteronmetabolieten op de epididymisfunctie</i>	43
4.3.1. <i>Effecten van androgenen op het behoud van het fertiliserend vermogen van spermatozoën in de epididymis</i>	
4.3.2. <i>Effecten van androgenen op de rijping van spermatozoën in de epididymis</i>	
4.4. <i>Androgeenbinding in de epididymis</i>	48
4.5. <i>Discussie</i>	49

HOOFDSTUK 5 HERSENEN EN TESTIKELHORMONEN

5.1. <i>Hersenen en testikelactiviteit</i>	52
--	----

5.2. Testikels en hersenactiviteit	53
5.3. Effecten van geslachtshormonen op de vroege ontwikkeling van de hersenen	54
5.4. Het testosteronmetabolisme in hersenweefsel	55
5.5. Oestrogeen- en androgeenreceptoren in hersenweefsel	56
5.5.1. Oestrogeenreceptoren in hersenweefsel	
5.5.2. Androgeenreceptoren in hersenweefsel	
5.6. De aanwezigheid van testosteron en zijn metabolieten in de celkernen van hersenweefsel	63
5.7. Samenvatting	64
HOOFDSTUK 6	EFFECTEN VAN TESTOSTERON OP HET PARINGSGEDRAG EN DE GONADOTROFINEN SECRETIE BIJ DE MANNELIJKE RAT
6.1. Inleiding	66
6.2. Effecten van testosteron op het paringsgedrag	66
6.3. Effecten van testosteron op de gonadotrofinensecretie	73
6.4. Effecten van testosteron op de vroege ontwikkeling van de hersenen	76
6.5. Samenvatting	81
HOOFDSTUK 7	SAMENVATTING
	82
SUMMARY	85

LITERATUURLIJST	88
TRIVIALE EN SYSTEMATISCH NAMEN	106
AFKORTINGEN EN SYMBOLEN	107
NAWOORD	108
CURRICULUM VITAE	110



HOOFDSTUK 1

PRODUKTIE, EFFECTEN EN WERKINGSWIJZE VAN TESTOSTERON

1.1. De produktie van testosteron door de testikel

Van oudsher is bekend dat castraties uitgevoerd bij mens of dier, grote effecten hebben op hun uiterlijk en gedrag. Een bevredigende verklaring voor de wijze waarop het effect van deze ingreep tot stand kwam, was er evenwel niet. In 1849 beschreef de Duitser Berthold de effecten van het verwijderen en transplanteren van testikels bij hanen. Deze onderzoeker toonde aan dat de effecten van de testikels op uiterlijk en gedrag van de dieren tot stand komen door de produkten die zij aan het bloed afgeven. In 1935 slaagden onze landgenoten David, Dingemanse, Freud en Laqueur erin, uit stieren-testikels een chemisch zuiver produkt te isoleren, dat in de hane-kam test (zie onder) buitengewoon actief was; zij noemden deze stof testosteron. Pas in 1952 werd aangetoond dat deze stof ook werkelijk door de testikels werd afgescheiden (West, Hollander, Kritchevski en Dobriner).

Naast testosteron geven de testikels nog een groot aantal andere steroïden aan het bloed af. In tabel 1.1 zijn van enkele van deze steroïden de concentraties in het perifere en testikulaire veneuze bloed van de mens vermeld.

Uit deze gegevens blijkt dat testosteron in grotere hoeveelheden door de testikel wordt afgegeven dan de andere steroïden. Hiermee is niet gezegd dat de secretie van deze laatstgenoemde steroïden onbelangrijk is. Zo hebben verschillende van de in tabel 1.1 vermelde steroïden, na inspuiting bij proefdieren grote effecten op

bepaalde weefsels en organen.

De androgene werking (androgeniciteit) van steroiden kan bepaald worden door hun effect op de groei van de kam van de kapoen of op de gewichtstoename van de prostaat en de zaadblazen van de gecastreerde rat te meten. In tabel 1.2 is de 'androgeniciteit' van de in ta-

Tabel 1.1. De concentratie van enkele steroiden in het menselijke testikulaire en perifere veneuze plasma.

steroid	testikulaire veneus plasma (ng/ml)	perifeer veneus plasma (ng/ml)
testosteron	751	5,6
androstenedion	30,7	0,9
dehydroepiandrosteron	73,1	3,9
dihydrotestosteron	4,2	0,3
androsteron	0,67	0,31
oestradiol	1,289	0,025
oestron	0,306	0,061

Gegevens van Fiorelli, Borrelli, Forti, Gonnelli, Pazzagli en Serio, 1976; Hammond, Ruokonen, Kontturi, Koskela en Vihko, 1977; Weinstein, Kelch, Jenner, Kaplan en Grumbach, 1974.

bel 1.1 genoemde steroiden vermeld. Wanneer de effecten van de verschillende steroiden op de groei van de prostaat bij mens en rat in sterkte vergelijkbaar zouden zijn, dan zou bij de mens het effect van het door de testikels afgegeven testosteron dat van de andere in tabel 1.1 vermelde steroiden vele tientallen malen overtreffen.

Tabel 1.2. *De biologische activiteit van enkele androgenen ten opzichte van die van testosteron**.

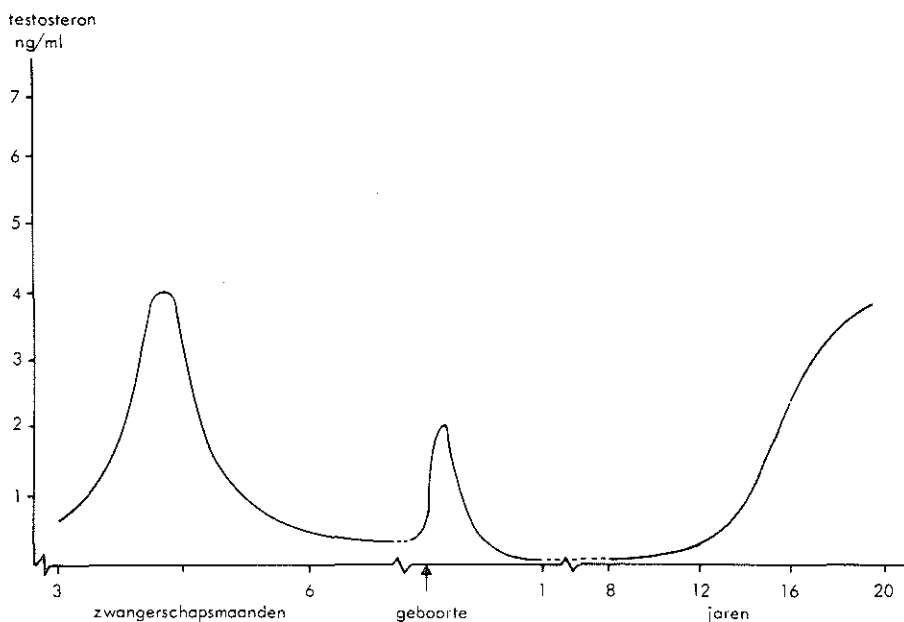
androgeen	ratteprostaat	hanekam
testosteron	100	100
androsteeendion	39	120
dehydroepiandrosteron	34	16
dihydrotestosteron	260	220
androsteron	53	115
3 α -androstaandiol	24	75
3 β -androstaandiol	3	2
androstaandion	33	110

*De activiteit van testosteron is op 100 gesteld.

Gegevens van Williams-Ashman, 1975.

1.2. *Enkele effecten van testosteron*

Al vroeg tijdens de ontwikkeling van mannelijke zoogdieren wordt testosteron door de testikels aan het bloed afgegeven. Deze vroege androgeensecretie, die bij zoogdieren op een enkele uitzondering na tijdens de zwangerschap plaatsvindt, veroorzaakt onder andere de ontwikkeling van die organen en weefsels, die op een latere leeftijd een rol spelen bij de voortplanting (hoofdstuk 5). Vervolgens neemt bij sommige van de tot nu toe onderzochte diersoorten zoals de cavia (Rigaudière en Wolff, 1977; Vreeburg, Woutersen, Ooms en Van der Werff ten Bosch, 1977) en bij de mens (figuur 1.1) de testosteronconcentratie in het perifere plasma tijdens de zwangerschap weer af; bij andere dieren zoals de koe (Challis, Kim, Naftolin, Judd, Yen en Benirschke, 1974) en de resus-aap (Resko, Malley, Begley en Hess,



Figuur 1.1. De plasma testosteronconcentratie tijdens de ontwikkeling van het mannelijk individu. Gegevens van Reyes, Boroditsky, Winter en Faiman, 1974; Forest, Sizonenko, Cathiard en Bertrand, 1974; Knorr, Bidlingmaier, Butenandt, Fendel en Ehrt-Wehle, 1974.

1973) blijft deze vrijwel de gehele zwangerschap hetzelfde. Bij pasgeboren jongetjes stijgt de testosteronconcentratie in het bloed vlak na de geboorte, blijft een paar maanden hoog en daalt vervolgens weer. De fysiologische betekenis van dit fenomeen is onbekend. Tot aan de puberteit blijven de testosteronconcentraties laag. Het is niet duidelijk of het testosteron gedurende deze periode ook zonder effect is. Zeker is, dat de hernieuwde testikelactiviteit bij het begin van de puberteit een grote verscheidenheid van processen op gang brengt of versterkt. In korte tijd bereiken die organen en weefsels die bij de voortplanting betrokken zijn hun

volwassen grootte, en komen de secundaire geslachtskenmerken tot ontwikkeling: de stem wordt lager, de beharing verandert en een aantal veranderingen in het uiterlijk vinden plaats.

Zeer ingrijpend zijn de effecten die testosteron tijdens deze periode heeft op het skelet, de spieren en het vetweefsel, weefsels die samen ongeveer 70% van het totale lichaamsgewicht uitmaken.

Tijdens de puberteit neemt de snelheid waarmee jongens en meisjes groeien eerst toe en daarna af (Van der Werff ten Bosch, 1977). De toename in de groeisnelheid wordt veroorzaakt doordat de botvorming aan de uiteinden van de pijpbeenderen onder invloed van gonadehormonen (bij jongens testosteron, bij meisjes oestrogenen) sneller verloopt. Deze snelle groei is slechts tijdelijk omdat gedurende dit proces de kraakbeenschijven, waar de botvorming plaatsvindt, onder invloed van testosteron (of oestradiol) verdwijnen. Testosteron heeft dus het paradoxale effect enerzijds de groei te versnellen en haar anderzijds te beëindigen. Mensen bij wie om een of andere reden de puberteit uitblijft, zijn aanvankelijk kleiner dan hun leeftijdsgenoten, maar doordat hun lengtegroei tot op oudere leeftijd langzaam doorgaat, komt hun lengte uiteindelijk boven het normale. Ook op het uitgegroeide skelet zou testosteron effecten hebben. Zo bericht Hamilton (1948) dat eunuchen (gecastreerde mannen) vaker dan andere mannen last hebben van een kromme rug (kyfose). Dit verschijnsel zou veroorzaakt worden doordat bij deze mensen de ontkalking van de wervellichamen -een proces dat bij iedereen tijdens het ouder worden plaatsvindt- sneller dan normaal verloopt.

De lichaamssamenstelling van mannen en vrouwen verschilt sterk. "The difference between the body build of women and men has attracted the attention of mankind throughout history. For thousands of years, painters, sculptors and poets have interpreted the beauty of the

male and female body in colour, stone and word. Expressed in a concrete and unpoetic way, the beauty of a woman is a function of her larger amount of fatty tissue; that of a man, of his larger amount of muscles" (Ljunggren, 1965). De totale hoeveelheid vet wordt bij 17-jarige vrouwen geschat op 25% van het lichaamsgewicht; bij 17-jarige mannen op 12% (Widdowson, 1974). Op 10-jarige leeftijd is de hoeveelheid vet bij beide geslachten echter nagenoeg gelijk; bij meisjes 16% en bij jongens 18%. De geslachtsverschillen in vet ontstaan dus voor een belangrijk gedeelte tijdens de puberteit. Betrouwbare gegevens betreffende de spiermassa bij jongens en meisjes voor en na de puberteit zijn mij niet bekend. Wel zijn de veranderingen in de doorsnede van arm- en beenspieren met behulp van röntgenfoto's onderzocht. Tanner (1965) nam met behulp van deze techniek waar, dat bij jongens tijdens de puberteit de spieroppervlakte op een dwarsnede veel sterker toenam dan bij meisjes. Hoewel in beide geslachten een toename in vet viel waar te nemen, was deze bij meisjes beduidend sterker dan bij jongens.

Het verschil in de ontwikkeling van vet en spier tussen mannen en vrouwen wordt waarschijnlijk in belangrijke mate veroorzaakt door testosteron. Een aanwijzing hiervoor is de waarneming dat eunuchen dikwijls meer vet en minder spieren hebben dan normaal bij hun leeftijds-genoten gezien wordt (Hamilton, 1948). Beter gedocumenteerd is het werk van Vague, Rubin, Jubelin, Lam-Van, Aubert, Wasserman en Fondarai (1974), die patiënten bij wie de testikels afwezig waren of onvoldoende testosteron produceerden, met langwerkende testosteronpreparaten behandelden. Bij deze patiënten nam de spiermassa met 27% toe, terwijl hun vetmassa met 33% afnam.

1.3. *Werkingswijze van testosteron*

1.3.1. *Het receptormodel*

Volgens de huidige opvattingen (King en Mainwaring, 1974), komen de effecten van steroïden tot stand na binding op cellulair niveau van het steroïd aan cytoplasmatische receptoren. Na een 'activering'-fase in het cytoplasma, die waarschijnlijk leidt tot bepaalde veranderingen in zijn structuur, verdwijnt het steroïd-receptor complex uit het cytoplasma naar de celkern. Hier wordt door het complex de vorming van bepaalde RNA-moleculen gestart of versterkt, hetgeen uiteindelijk leidt tot het hormoon-effect.

Uit talrijke studies is gebleken dat steroïdreceptoren ongeacht het steroïd dat zij binden, of het weefsel waarin zij voorkomen, bepaalde kenmerken gemeen hebben. Receptoren die testosteron, dihydrotestosteron of oestradiol binden zijn grote eiwitmoleculen die bij een laag zoutgehalte in sucrosegradiënten een sedimentatieconstante van ongeveer 8S hebben. Zij binden met een hoge affiniteit ($K_a > 10^9 M^{-1}$) een klein aantal steroïdmoleculen. Voorts binden zij vrijwel alleen steroïden van een bepaald type.

De laatste jaren zijn steroïd-bindende eiwitten met de zojuist genoemde eigenschappen aangetoond in weefsels, waarvan niet duidelijk is of zij daar een fysiologische betekenis hebben. Ondanks dit feit worden deze eiwitten toch receptoren genoemd. In andere weefsels, zoals de lever van de kip (Mester en Baulieu, 1972) en het beenmerg van de rat (Minguell en Valladares, 1974) zijn geen oestradiol- of testosteronreceptoren in het cytoplasma aantoonbaar, ondanks een duidelijk effect van deze steroïden. Het is dus twijfelachtig of alle steroïd-effecten altijd en in alle weefsels tot stand komen via het gangbare receptormodel.

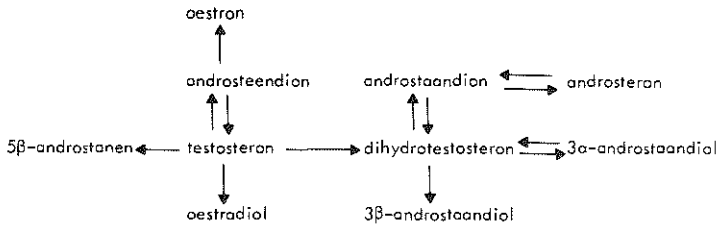
1.3.2. *Het metabolisme van testosteron in androgeengevoelige weefsels*

Aanvankelijk werd aangenomen dat steroidhormonen in die weefsels waar zij actief waren niet werden omgezet; omzettingen zoals die in de lever zouden leiden tot de vorming van produkten met een geringe biologische activiteit.

In 1963 toonden Farnsworth en Brown aan dat in prostaatweefsel testosteron omgezet werd in andere androgenen. Voorts vestigden zij de aandacht op het feit dat twee van de gevormde produkten, dihydrotestosteron en 3α -androstaandiol in de hanekam-test vrijwel net zo werkzaam waren als testosteron. Toen bleek dat na inspuiting van of incubatie met testosteron vrijwel uitsluitend dihydrotestosteron in de kern van de prostaatcellen aanwezig was, leek er geen reden te bestaan om aan de bijzondere betekenis van dit androgeen te twijfelen (Bruchovsky en Wilson, 1968; Anderson en Liao, 1968).

Het was echter niet duidelijk welk effect de andere testosteronmetabolieten hadden. Robel, Lasnitzki en Baulieu (1971) bestudeerden dit probleem door zowel het metabolisme als de effecten van de gevormde metabolieten te onderzoeken bij stukjes prostaat in weefselkweek. Na incubatie van het prostaatweefsel met testosteron bleken dihydrotestosteron, 3α -androstaandiol en 3β -androstaandiol kwantitatief de belangrijkste metabolieten te zijn. In dit verband dient opgemerkt te worden dat wanneer in dit proefschrift over 3α - of 3β -androstaandiol wordt gesproken, uitsluitend de 5α -gereduceerde vorm van deze steroiden wordt bedoeld. Uit histologisch onderzoek van het prostaatweefsel dat gekweekt was in een medium waaraan testosteron, dihydrotestosteron of de androstaandiolen waren toegevoegd, bleek dat er belangrijke verschillen waren in de effecten die door de verschillende steroiden teweeggebracht werden. De overeenkomstige 17-ketosteroiden en de 5β -androstanen hadden in dit teststelsel nauwelijks effect. Om deze gegevens te kunnen interpreteren, werd onderzocht in welke mate de geteste

androgenen in het prostaatweefsel in elkaar werden omgezet. Hierbij bleek dat de omzetting van dihydrotestosteron naar testosteron niet en die van 3β -androstaandiol naar dihydrotestosteron vrijwel niet meetbaar was (figuur 1.2). Het effect van dihydrotestosteron kan dus



Figuur 1.2. Enkele omzettingen van androgenen.

niet tot stand komen door het uit dit androgeen teruggevormde testosteron, maar wel door 3α -androstaandiol. De werking van 3β -androstaandiol zou daarentegen alleen maar door dit steroid zelf veroorzaakt kunnen worden. Uit dit onderzoek volgt dat de werking van testosteron in androgeengevoelige weefsels het resultaat kan zijn van een aantal verschillende processen die allemaal afzonderlijk door een bepaalde testosteronmetabooliet gestuurd worden.

Er zijn aanwijzingen dat niet in ieder weefsel dezelfde metaboolieten actief zijn. De 5β -androstanen die in de prostaat nagenoeg onwerkzaam zijn (Verjans en Eiknes, 1976), hebben bijvoorbeeld wel sterke effecten op de synthese van porfyrynes in levercellen (Granick en Kappas, 1967).

Het is al langere tijd bekend dat bij mannelijke dieren een klein percentage van het in de circulatie aanwezige testosteron en androsteendion in perifere

weefsels wordt omgezet in oestrogenen (figuur 1.2). Pas zeer recent is men tot het inzicht gekomen dat deze omzetting in bepaalde weefsels een essentieel onderdeel vormt van het mechanisme van werking van testosteron. De gegevens die tot deze inzichten hebben geleid, worden besproken in de hoofdstukken 5 en 6.

1.4. Vraagstelling

Toen duidelijk werd, dat de aanwezigheid van dihydrotestosteron in de prostaat van grote betekenis was voor het functioneren van dit orgaan, besloten wij te onderzoeken of dit ook het geval zou kunnen zijn in de epididymis. Dit orgaan werd gekozen omdat er op het moment dat wij deze keuze maakten, vrijwel geen gegevens waren over de wijze waarop testosteron de fertiliteit van de spermatozoën in de epididymis beïnvloedde.

In een later stadium van onderzoek, toen inmiddels duidelijk geworden was dat dihydrotestosteron een bijzonder belangrijk androgeen voor de epididymis was, werd bericht dat dit in de voortplantingsorganen zo werkzame androgeen, op bepaalde bij de voortplanting betrokken gedragingen totaal geen effect had. Naar aanleiding hiervan hebben wij onderzocht of wellicht andere testosteronmetabolieten in de hersenen actief waren.

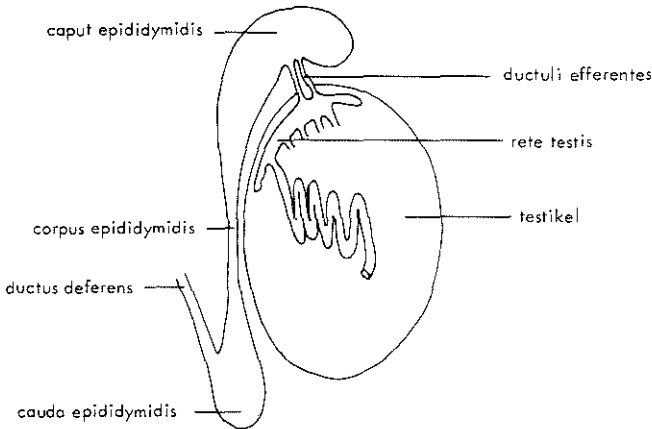
De eerste hoofdstukken van dit proefschrift zijn gewijd aan de functie van de epididymis (hoofdstuk 2), de lokalisatie en concentratie van testosteron en dihydrotestosteron in dit orgaan (hoofdstuk 3), en de betekenis van dihydrotestosteron voor de epididymisfunctie (hoofdstuk 4). In hoofdstuk 5 en hoofdstuk 6 zijn het testosteronmetabolisme en de effecten van de uit testosteron gevormde metabolieten op bepaalde hersenfuncties beschreven. In hoofdstuk 7 worden de verschillen in de wijze waarop de effecten van testosteron in beide weefsels tot stand komen, besproken.

HOOFDSTUK 2

DE EPIDIDYMIS

2.1. Inleiding

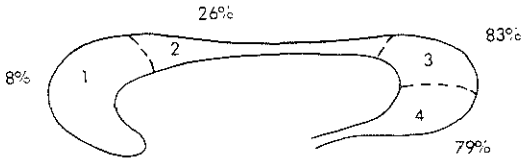
De epididymis bestaat uit een lange opgerolde buis die de testikel met het ductus deferens verbindt (figuur 2.1). De lengte van het epididymale kanaal is verbazingwekkend. Liggen de schattingen voor de menselijke epididymis tussen de 3 en 7 meter, voor het varken, het schaap



Figuur 2.1. De testikel en de epididymis van de rat.

en de stier worden getallen genoemd van 40 tot 65 meter (Maneely, 1959). De spermatozoën leggen deze afstand in 1 tot 3 weken af (Rowly, Teshima en Heller, 1970). Tijdens de passage door het eerste gedeelte van dit orgaan ondergaan de spermatozoën een aantal morfologische en

biochemische veranderingen die leiden tot hun fertiliserend vermogen (Bedford, 1975). Spermatozoën uit de ca-



Figuur 2.2. Het percentage varkens dat drachtig werd na kunstmatige inseminatie met spermatozoën uit 4 verschillende gebieden van de epididymis. 1=caput; 2=corpus; 3=proximale cauda; 4=distale cauda.

Gegevens van Holtz en Smidt (1976).

put epididymidis van de tot nu toe onderzochte species zoals het konijn (Bedford, 1966), de rat (Blandau en Rumery, 1964), de hamster (Horan en Bedford, 1972) en het varken (figuur 2.2; Holtz en Smidt, 1976) blijken in tegenstelling tot die uit de cauda, bij kunstmatige inseminatie niet of maar incidenteel vruchtbaar te zijn.

De fertiele spermatozoën worden bewaard in de cauda epididymidis waar zij lange tijd hun fertiliserend vermogen behouden.

2.2. De rijping van spermatozoën

Tournade beschreef al in 1913 dat bij de hond, de kat, de cavia, het konijn en de rat vrijwel alle spermatozoën uit de caput onbeweeglijk zijn wanneer zij in een fysiologische zout-oplossing gebracht worden, terwijl die uit de cauda onder dezelfde omstandigheden goede zwimmers blijken. Hij concludeerde hieruit dat spermatozoën tijdens hun passage door de epididymis het vermogen tot motiliteit verkrijgen. Hij nam aan dat secreten die door het epididymis-epitheel werden afgescheiden, de

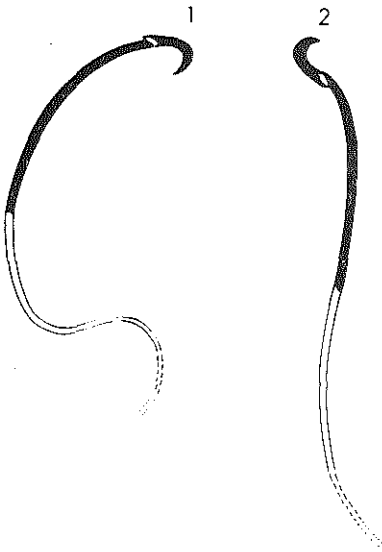
rijping veroorzaakten. Young (1929, 1931) was het met deze opvatting niet eens. Hij was van mening, dat de spermatozoën in de testikel onvoldoende tijd krijgen om volledig tot ontwikkeling te komen en dat zij daarom de laatste fase van dit proces in de epididymis moeten doormaken. In de epididymis zouden volgens hem geen andere tot rijping aanzettende factoren aanwezig zijn dan in de testikel. Een sterke aanwijzing hiervoor meende hij te vinden in de waarneming dat bij de cavia spermatozoën die tot een langer dan normaal verblijf in de testikel gedwongen waren door een ligatuur rond de kop van de epididymis, *in vitro* veel beweeglijker bleken dan die uit normale testikels. Daarnaast vond hij dat het fertiliserend vermogen van cavia-spermatozoën bij een langdurig gedwongen verblijf in het proximale gedeelte van de epididymisstaart was toegenomen; de rijping bleek dus op deze 'vreemde' plaats te zijn doorgegaan. Toch kan niet gesteld worden dat Young dacht dat het milieu in de epididymis onbelangrijk was voor de rijping. In 1929 schrijft hij: "The epididymis is simply a reservoir for sperm in which the processes of sperm development which start while they are still contained in the testis are free to continue because of the favourable environment present in the epididymis".

Maneely komt in 1959 in een uitvoerig overzicht tot de conclusie dat de rol van de epididymis bij de rijping onduidelijk is: "But although it has been believed for many years that the spermatozoa in most mammals undergo a 'ripening' or maturation process after they leave the testicle, it has never been clearly established whether or not the factors governing such 'ripening' are intrinsic to the spermatozoa or reside in the epithelium that surrounds them".

Orgebin-Crist (1967) was de eerste die aantoonde dat de ontwikkeling tot fertiele spermatozoën alleen maar kan optreden in bepaalde gebieden van de epididymis.

Zij deed dit door bij konijnen de fertiliteit te bepalen van spermatozoën die gedurende kortere of langere tijd in bepaalde gebieden van de epididymis tussen ligaturen waren vastgehouden. Uit haar onderzoek bleek, dat al snel na het aanbrengen van de ligaturen uit het proximale gedeelte van het corpus spermatozoën geïsoleerd konden worden die bij kunstmatige inseminatie vruchtbaar waren; een ongewone situatie omdat spermatozoën uit dat gebied normaal vrijwel nooit fertiel zijn. Op geen enkel tijdstip na het aanleggen van de ligaturen konden fertiele spermatozoën uit het iets meer naar de testikel gelegen caputgebied geïsoleerd worden. Zij concludeerde hieruit: "... it seems that spermatozoa need the special environment created by the epithelium of the corpus epididymidis". Een reeks vrijwel identiek uitgevoerde experimenten werd met gelijkloidend resultaat door Bedford (1967) gedaan. Opmerkelijk is zijn vondst dat 12-15 dagen na het aanbrengen van een ligatuur op het distale deel van het corpus, spermatozoën geïsoleerd uit de kop weliswaar net zo beweeglijk zijn als geëjaculeerde spermatozoën, maar totaal niet vruchtbaar. Bij het konijn komen kennelijk de structuren die betrokken zijn bij de voortbeweging van de spermatozoën volledig tot ontwikkeling in een milieu dat voor de rijping van andere structuren, die onontbeerlijk zijn voor bevruchting, ongunstig is.

Bij de hamster worden spermatozoën pas fertiel wanneer zij het proximale gedeelte van de staart bereiken. Wordt dit door middel van een ligatuur tussen het corpus en de cauda belet, dan blijven zij onvruchtbaar (Horan en Bedford, 1972). Hetzelfde is bij de rat het geval (Burgos en Tovar, 1974). Na een ligatuur rond het distale gedeelte van de caput, werd wel het aantal bewegende spermatozoën in de kop groter, maar trad geen verandering op in de wijze van voortbeweging die bestaat uit het zwemmen in cirkels. Deze beweging ontstaat doordat



Figuur 2.3. De vorm van een spermatozoön uit de kop (1) en uit de staart (2) van de epididymis van de rat. Het donkere gedeelte van de staart van spermatozoön 1 blijft gebogen tijdens de slagbewegingen van de rest van de staart.

het voorste gedeelte van deze spermatozoën gebogen is (figuur 2.3; Fray, Hoffer en Fawcett, 1972).

Er is betrekkelijk weinig informatie over de rijping van spermatozoën bij de mens. Zeker is evenwel dat tijdens hun passage door de epididymis de motiliteit sterk toeneemt (Bedford, Calvin en Cooper, 1973).

2.3. Opslag van spermatozoën

De staart van de epididymis -een stukje weefsel van ongeveer 0,3 g- bevat bij de door ons gebruikte ratten rond de 150 miljoen spermatozoën (Vreeburg, 1975). Bij deze diersoort verlaten per dag spontaan, zonder dat de dieren paren, 10-15 miljoen spermatozoën de staart (Vreeburg, Van Andel, Kort en Westbroek, 1974); op deze wijze kan dus binnen 15 dagen de hele voorraad spermatozoën vernieuwd worden. Bij dieren die regelmatig paren verblijven de spermatozoën veel korter in de staart. Bij de eerste ejaculatie -ratten kunnen een groot aantal malen ejaculeren- worden al 60 miljoen spermatozoën uitgestoten (Blandau en Odor, 1949).

De maximale levensduur van de in de staart opgesla-

gen spermatozoën is langer dan 15 dagen. De eersten die hiernaar onderzoek verrichtten waren Hammond en Asdell (1926). Deze onderzoekers lieten zien dat konijnen waarbij de aanvoer van nieuwe spermatozoën naar de staart verhinderd wordt, 38 dagen vruchtbaar bleven. Onlangs bleek dat bij deze species het fertiliserend vermogen van de spermatozoën in de cauda zelfs nog langer (42-49 dagen) in stand kan blijven (Tesh en Glover, 1969). Dit is een lange tijd wanneer we bedenken dat de gemiddelde verblijfsduur in de cauda bij seksueel inactieve dieren maar 6 dagen bedraagt (Orgebin-Crist, 1965).

De spermatozoën van de rat worden na een verblijf van ongeveer 30 dagen in de cauda onvruchtbaar (hoofdstuk 4). Bij de hamster en de muis blijven de caudale spermatozoën ongeveer 25 dagen vruchtbaar (Lubicz-Nawrocki, Lau en Chang, 1973). Bij alle drie bovengenoemde diersoorten duurt de beweeglijkheid langer dan het fertiliserend vermogen. In dit verband dient opgemerkt te worden dat wanneer over beweeglijkheid gesproken wordt, steeds bedoeld wordt het vermogen om te bewegen. Immers, spermatozoën opgesloten in de epididymis of geïsoleerd in onverdunde luminale vloeistof liggen volmaakt stil (Wyker en Howards, 1977). Aan deze rusttoestand komt een abrupt einde wanneer zij de epididymis verlaten. Het menselijk spermatozoön kan zich met een snelheid van 0,25 cm (50 maal zijn lengte) per minuut voortbewegen (Bishop en Walton, 1960). Deze krachts-explosie is evenwel van korte duur. In de uterus of tuba van vrouwelijke dieren blijven spermatozoën zelden langer dan 24-48 uur in leven.

2.4. *Het milieu in de epididymis*

De factoren die leiden tot de ontwikkeling en instandhouding van het fertiliserend vermogen van de sperma-

tozoën in de epididymis moeten gezocht worden in de vloeistof die zich in het lumen van dit orgaan bevindt.

Tabel 2.1. Enkele gegevens* over het milieu in de epididymis van de rat.

	vloeistof uit			serum
	rete testis	epididymis		
		kop	staart	
Na ⁺ (mEq/l)	143	58	15	160
K ⁺ (mEq/l)	14	23	46	4
Cl ⁻ (mEq/l)	140	31	24	112
glycerylfosforylcholine (mg/ml)	-	-	11,3	n.m. ^{**}
carnitine (mg/ml)	-	-	10,0	0,003
siaalzuur (mg/100 mg eiwit)	-	3,1	7,4	-
eiwit (mg/ml)	2,4	-	38	63
pH	-	6,5	6,9	7,5
PO ₂ (mm Hg)	18	23	24	87 ^{***}
osmolaliteit (osmol/kg)	328	315	329	311

* Gegevens van Back, Shenton en Glover, 1974; Brooks, Hamilton en Mallek, 1974; Free, Schluntz en Jaffe, 1976; French en Ritzén, 1973a; Gupta, Rajalaksmi, Prasad en Moudgal, 1974; Tuck, Setchell, Waites en Young, 1970; Turner, Hartmann en Howards, 1977.

** Niet meetbaar.

*** Waarde in arterieel bloed.

Naarmate meer informatie beschikbaar komt over de samenstelling van deze vloeistof, wordt duidelijker dat het milieu in het lumen van de epididymis bijzonder is en volkomen afwijkend van bijvoorbeeld de samenstelling van het bloed. Dit moge blijken uit tabel 2.1, waarin een

aantal gegevens over de luminale vloeistof van de rat vermeld zijn.

De samenstelling van de luminale vloeistof is het resultaat van processen van absorptie en secretie die in de epididymis plaatsvinden. Opvallend is de enorme resorptie van water. Bij de rat bijvoorbeeld, stroomt per dag ongeveer 0,75 ml vloeistof vanuit één testikel (1,5 g) de epididymis binnen (Tuck, Setchell, Waites en Young, 1970). Met één ml van deze vloeistof komen 34 miljoen spermatozoën de epididymis binnen. In de kop van de epididymis zijn al 660 miljoen spermatozoën in één ml luminale vloeistof aanwezig, terwijl er in de staart meer dan 1,8 miljard per ml vloeistof voorkomen (Turner, Hartmann en Howards, 1977). De vloeistof in de staart is dus meer dan 50 maal ingedikt. Tegelijk met het water wordt Na^+ het lumen uitgepompt en K^+ erin gebracht. Naast deze ionen worden ook organische stoffen in het lumen afgescheiden. Sommige van deze stoffen, zoals carnitine en glycerylfosforylcholine, komen in uitzonderlijk hoge concentraties voor. Carnitine wordt door de epididymis uit het bloed opgenomen en in de luminale vloeistof gebracht. Dit proces vindt in het hele orgaan plaats zodat de concentratie van carnitine stroomafwaarts naar de staart toe groter wordt (Brooks, Hamilton en Mallek, 1973). Daarentegen wordt glycerylfosforylcholine vooral in het eerste gedeelte van de epididymis (Brooks, Hamilton en Mallek, 1974) na daar gesynthetiseerd te zijn (Wallace, Wales en White, 1966), in het lumen afgescheiden. Onlangs zijn in de luminale vloeistof ook eiwitten aangetoond, die noch in de testikel noch in het serum voorkomen (Koskimies en Kormanó, 1975). De hierboven gegeven opsomming is geenszins volledig; met name de aanwezigheid van androgenen in de vloeistof die zich in de rete testis en epididymis bevindt, is buiten beschouwing gebleven. Tenslotte zij opgemerkt dat van geen van bovengenoemde stoffen de betekenis voor de rijping en opslag bekend is.

2.5. Enkele effecten van testosteron op de epididymis

De epididymis is in sterke mate afhankelijk van androgenen. Bij volwassen ratten neemt dit orgaan in de eerste week na castratie 70% in gewicht af. Daarna treedt nog maar een zeer gering gewichtsverlies op (Po-destà, Calandra, Rivarola en Blaquier, 1975). Deze gewichtsafname is voor een gering percentage (hoofdstuk 3) het gevolg van het verdwijnen van de spermatozoën. De grootste gewichtsvermindering wordt veroorzaakt door een afname in grootte van de epididymiscellen en de diameter van het lumen (Maneely, 1959). De verschrompeling van het epididymisweefsel na castratie blijkt gepaard te gaan met grote veranderingen in de samenstelling van de vloeistof in het lumen van de epididymis. Bij het konijn wordt na castratie de Na^+ -concentratie in de luminale vloeistof van de staart van de epididymis 4 maal zo groot. De concentraties van glycerylfosforylcholine, carnitine en eiwit nemen daarentegen sterk af (Jones en Glover, 1973). Door de veranderingen in de luminale vloeistof na castratie blijft de ontwikkeling van onrijpe spermatozoën die zich op dat moment in de kop bevinden uit, terwijl in de staart een snelle degeneratie van de rijpe spermatozoën optreedt (zie hoofdstuk 4).

De meeste morfologische en biochemische veranderingen die na castratie in de epididymis optreden, zijn door toediening van testosteron te voorkomen of, wanneer zij al zijn ingetreden, op te heffen. Bepaalde veranderingen kunnen echter maar ten dele tenietgedaan worden. Zo daalt, om een enkel voorbeeld te geven, de activiteit van het enzym glycerylfosfaatdehydrogenase (de activiteit in de spermatozoën is verwaarloosbaar) na castratie in de kop van de epididymis tot 40% van zijn oorspronkelijke waarde. Toediening van testosteron veroorzaakt maar een gedeeltelijk herstel van de

specifieke activiteit tot ongeveer 60% van zijn oorspronkelijke waarde (Brooks, 1976).

2.6. Samenvatting

Bij zoogdieren vindt in de epididymis rijping en opslag van spermatozoën plaats. Deze processen zijn waarschijnlijk afhankelijk van de samenstelling van de vloeistof, die zich in het lumen van de epididymis bevindt. De epididymis is een androgeen-afhankelijk orgaan. Na castratie verandert het milieu in het lumen van de epididymis en degenereren de spermatozoën die op het moment van castratie aanwezig zijn.

HOOFDSTUK 3

DE CONCENTRATIE VAN TESTOSTERON EN DIHYDROTESTOSTERON IN

DE EPIDIDYMIS VAN DE RAT

3.1. Inleiding

In 1969 nam Aafjes waar dat bij enkele onvruchtbare patiënten met onbeweeglijke spermatozoën in het ejaculaat toediening van Proviron (1α -methyl-dihydrotestosteron) een duidelijke verbetering in de motiliteit van de spermatozoën veroorzaakte. Kort hierop verscheen een publikatie waarin een soortgelijke waarneming werd beschreven (Ludvik, 1970). De snelheid waarmee het effect tot stand kwam, maakte het waarschijnlijk dat 1α -methyl-dihydrotestosteron het functioneren van de epididymis verbeterd had, omdat de ontwikkeling van onbeweeglijke tot beweeglijke spermatozoën een kortdurend proces is, dat plaatsvindt in de epididymis (hoofdstuk 2). Deze waarnemingen en een publikatie die aangaf dat de epididymis het enzym 5α -steroidreductase bevatte (Inano, Machino en Tamaoki, 1969), brachten ons ertoe de concentraties van testosteron en dihydrotestosteron in de epididymis van de rat te onderzoeken.

Omdat de epididymis functioneel een eenheid vormt met de testikel, besloten wij ook in dit laatstgenoemde orgaan androgeenbepalingen uit te voeren. De resultaten van deze bepalingen zijn in tabel 3.1 samengevat. In dezelfde tabel zijn ook gegevens uit andere onderzoeken vermeld. De gegevens in tabel 3.1. laten zien dat de concentratie van dihydrotestosteron in de epididymis hoger is dan die van testosteron. In de testikel

is de verhouding tussen deze androgenen omgekeerd; in dit orgaan komt meer testosteron dan dihydrotestosteron voor. In alle tot nu toe onderzochte androgeengevoelige

Tabel 3.1. De concentraties van testosteron en dihydrotestosteron (ng/g) in de epididymis en de testikel van de rat (gemiddelden \pm standaardfouten van het gemiddelde).

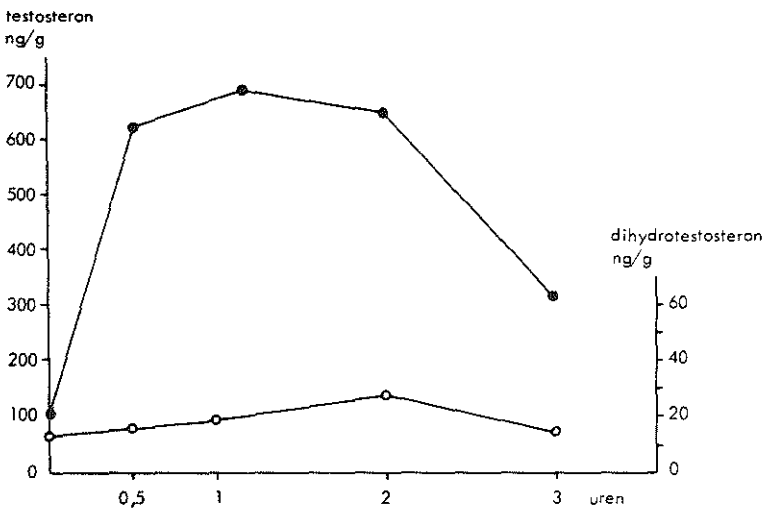
leeftijd van de ratten	testosteron	dihydrotestosteron
	epididymis	
60 dagen ¹	5,7	19,3
90 dagen ²	5,2 \pm 0,55	44,0 \pm 3,2
120 dagen ¹	18,1	59,6
	testikel	
90 dagen ²	117 \pm 20	10,0 \pm 1,8
90 dagen ³	63	8,3
147 dagen ⁴	46,6 \pm 1,2	6,4 \pm 0,4

Gegevens van: ¹Podestá, Calandra, Rivarola en Blaquier, 1975; ²Vreeburg en Aafjes, 1971; ³Podestá en Rivarola, 1974; ⁴Folman, Sowell en Eik-Nes, 1972.

weefsels zijn veel lagere dihydrotestosteronconcentraties gevonden. Zo bevatten de prostaat en de zaadblazen van de rat niet meer dihydrotestosteron dan 2 tot 3 ng/g weefsel (Robel, Corpéchet en Baulieu, 1973), terwijl in plasma waarden van minder dan 0,4 ng/ml worden gevonden (Coyotupa, Parlow en Kovacic, 1973; Gupta, Rager, Zarzycki en Eichner, 1975; Corpéchet, Eychenne en Robel, 1977).

3.2. *De produktie van testosteron door de testikel en de dihydrotestosteronconcentratie in de epididymis*

In een volgend experiment werd onderzocht, of er een samenhang bestaat tussen de dihydrotestosteronconcentratie in de epididymis en de testosteronproduktie door de testikel. Met dit doel werden ratten met 100 I.E. humaan chorion gonadotrofine (HCG, Pregnyl, Organon) intramusculair ingespoten. Op verschillende tijdstippen na inspuiting werden de ratten gedood en de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de testikel en de epididymis bepaald. Uit de verkregen resultaten (figuur 3.1) bleek dat al kort na HCG-inspuiting de testosteronconcentratie in de testikels sterk was

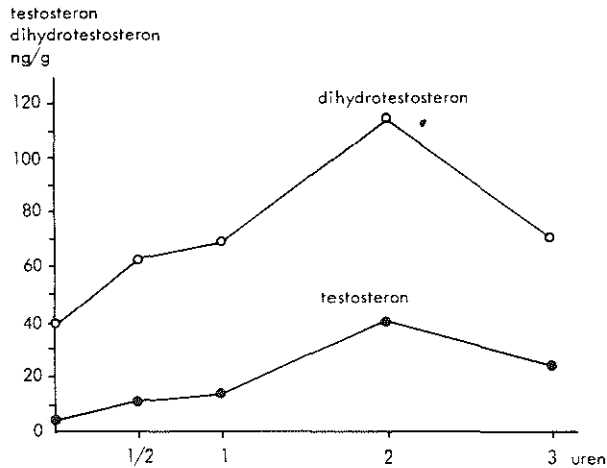


Figuur 3.1. *De concentraties van testosteron en dihydrotestosteron in ratte-testikels op verschillende tijden na toediening van 100 I.E. humaan chorion gonadotrofine. Gegevens van Vreeburg en Aafjes, 1971.*

toegenomen. De toename in dihydrotestosteron was tra-

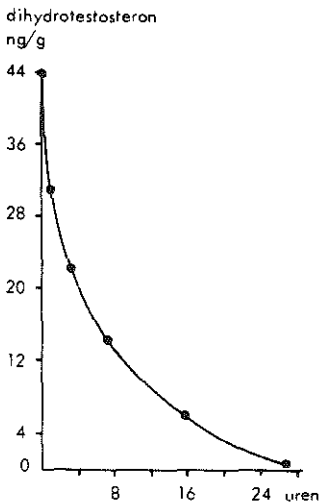
ger en kleiner. Folman, Sowell en Eik-Nes (1972) bepaalden de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de testikels, 8 uur na een injectie met 500 I.E. HCG. Deze onderzoekers vonden dat de testosteronconcentratie in de testikels door de behandeling met HCG 3 maal zo groot geworden was. De dihydrotestosteronconcentratie was evenwel maar de helft van de waarde die in de testikels van controledieren werd waargenomen. Uit beide onderzoeken volgt, dat in de testikel een toename van testosteron niet leidt tot eenzelfde verandering in de dihydrotestosteronconcentratie.

In de epididymis ging een toename in de endogene testosteronconcentratie wel gepaard met een evenredige toename in de dihydrotestosteronconcentratie (figuur 3.2).



Figuur 3.2. De concentraties van testosteron en dihydrotestosteron in ratte-epididymides op verschillende tijden na toediening van 100 I.E. humaan chorion gonadotrofine. Gegevens van Vreeburg en Aafjes, 1971.

Na castratie worden binnen 2 uur de concentraties van testosteron en dihydrotestosteron in het bloed onmeetbaar laag (Coyupta et al., 1973). De snelheid waarmee dihydrotestosteron uit de epididymis verdwijnt is veel kleiner (figuur 3.3). Een goed meetbare hoeveelheid dihydrotestosteron werd nog 16 uur na castratie in de epididymis aangetroffen. Werd 24 uur na castratie



Figuur 3.3. De dihydrotestosteronconcentraties in ratte-epididymides op verschillende tijden na castratie. Gegevens van Aafjes en Vreeburg, 1972.

weer een intramusculaire injectie van testosteron (1 mg in olie) gegeven, dan werden de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de epididymis 1 uur na toediening weer zeer hoog (70 ± 8 ng dihydrotestosteron/g, 21 ± 3 ng testosteron/g).

De dihydrotestosteronconcentratie in de epididymis blijkt dus afhankelijk te zijn van testosteron dat van elders aangevoerd wordt. De synthese van androgenen in de epididymis zelf (Hamilton en Fawcett, 1970) leidt niet tot een belangrijke testosteron- of dihydrotestosteronconcentratie in dit orgaan. Immers, 24 uur na castratie bleek de dihydrotestosteronconcentratie onmeetbaar laag te zijn. Wellicht is bij andere diersoorten de androgeen synthese in de epididymis van meer betekenis. Bij het hert is de vorming en de uitgroei van het gewei een jaarlijks terugkerend gebeuren, dat gekoppeld is aan de hoogte van de testosteronconcentratie in het bloed. Na castratie wordt bij deze dieren

een gewei gevormd met weinig vertakkingen. Lincoln (1975) vond bij één hert, waar hij wel de testikels maar niet de epididymides had verwijderd, een vrijwel normaal gewei. Dit zou het gevolg kunnen zijn van een secretie van androgenen door de epididymis.

3.3. De aanvoer van androgenen via de ductuli efferentes van de testikel en de androgeenconcentratie in de epididymis

De grootste hoeveelheid androgenen die per tijds-eenheid de epididymis bereikt, wordt door het perifere bloed aangevoerd. Per 24 uur stroomt ongeveer 100 ml bloed door een epididymis van 0,4 g (Setchell, Waites en Till, 1964), zodat bij een perifere plasma-testosteronconcentratie van 3 ng, ongeveer 300 ng dit orgaan doorspoelt. Daarnaast worden ook androgenen getransporteerd met de stroom vloeistof die via de ductuli efferentes het lumen van de epididymis bereikt. De hoeveelheid vloeistof die door een testikel van 1,3 g aan de epididymis wordt afgegeven, is ongeveer 0,65 ml per 24 uur (Tuck et al., 1970).

Om vast te stellen hoeveel testosteron en dihydrotestosteron de epididymis op deze wijze bereikt, werd de concentratie van deze androgenen in ductuli efferentes - vloeistof bepaald. Deze vloeistof werd verkregen door 24 uur na afbinding van de ductuli efferentes één van deze ductuli met een fijn glascapillair te canuleren. De door ons gevonden testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de vloeistof zijn, samen met andere gepubliceerde metingen, weergegeven in tabel 3.2.

Uit tabel 3.2 blijkt dat bij de rat door alle onderzoekers vrijwel dezelfde testosteronconcentraties zijn gevonden. Wat de dihydrotestosteronconcentraties betreft bestaat er een groot verschil tussen de waarden die door ons en Harris en Bartke (1975) zijn gevonden

Tabel 3.2. De testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties (ng/mL) in de rete testis-vloeistof van de rat, het konijn, de stier en de ram (gemiddelden \pm standaardfouten, of \pm standaardfouten van het gemiddelde).

testosteron	dihydrotestosteron	gegevens van
rat		
26,4 \pm 2,7*	-	Cooper en Waites, 1974
46,5 \pm 3,6*	4,9 \pm 1,5	Harris en Bartke, 1975
28,8 \pm 7,7	1,9 \pm 1,3	Vreeburg, 1975
28,7 \pm 5,8	32,7 \pm 16,6	Pujol, Bayard, Louvet en Boulard, 1976
33 \pm 3	-	Comhaire en Vermeulen, 1976
konijn		
57,4 \pm 33,4	21,3 \pm 9,5	Guerrero, Ritzén, Purvis, Hansson en French, 1975
stier		
33,1 \pm 2,6*	1,3 \pm 0,1	Ganjam en Amann, 1976
ram		
6,6 - 35,8**	3-19% van testosteron	Bartke en Voglmayr, 1977

* Standaardfout van het gemiddelde.

** Gebied waarbinnen de waarnemingen vielen.

en die welke door Pujol, Bayard, Louvet en Boulard (1976) worden opgegeven. Deze onderzoekers vonden evenveel testosteron als dihydrotestosteron in deze vloeistof. De oorzaak van dit verschil is onduidelijk. Ook bij het konijn, de ram en de stier zijn de concentraties van testosteron veel hoger dan die van dihydrotestosteron. Uitgaande van de door ons gevonden waarden, wordt per dag door één testikel via de ductuli efferentes on-

geveer 20 ng testosteron de epididymis ingebracht.

In een tweetal experimenten (tabel 3.3) werd het effect van afbinding van de ductuli efferentes op de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de epididymis onderzocht. In beide experimenten werden de ductuli efferentes van één van de twee testikels afgebonden. Aan de andere zijde werd een schijnoperatie

Tabel 3.3. De testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties (ng/g) in de epididymis na eenzijdige afbinding van de ductuli efferentes van de testikel of na eenzijdige castratie (gemiddelden \pm standaardfouten).

tijd na operatie	epididymis	dihydrotestosteron		testosteron	
		intacte kant	geïsoleerde kant	intacte kant	geïsoleerde kant
1 maand ¹	totaal	34,6	13,0	5,7	5,8
1 maand ²	totaal	45,4	10,0	11,2	7,7
1 week ³	proximale deel	36,4 \pm 7,1	10,2 \pm 0,7	5,6 \pm 1,9	3,8 \pm 1,2
	distale deel	10,8 \pm 4,4	9,0 \pm 3,6	2,5 \pm 1,6	1,7 \pm 0,6

Gegevens van: ¹Aafjes en Vreeburg, 1972; ²Podestá, Calandra, Rivalola en Blaquier, 1975; ³Vreeburg, 1975.

uitgevoerd. Vervolgens werden na 1 week (experiment 2) of 1 maand (experiment 1) de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de intacte en de afgebonden epididymis bepaald. In experiment 1 werden de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de hele epididymis gemeten. In experiment 2 werden de androgeenconcentraties gemeten in de proximale en distale gebie-

den die verkregen werden door de epididymis middendoor te knippen. In tabel 3.3 zijn onze resultaten vermeld samen met die van Podestá et al. (1975), die de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties na eenzijdige castratie onderzochten.

Uit tabel 3.3 blijkt dat na eenzijdige afbinding van de ductuli efferentes of na eenzijdige castratie, een sterke daling optreedt in de dihydrotestosteronconcentratie van de geïsoleerde epididymis. Deze afname wordt vrijwel uitsluitend veroorzaakt door de vermindering in de dihydrotestosteronconcentratie in het dichtst bij de testikel gelegen gedeelte. Dit is ook gevonden door Purvis en Hansson (1977) die bij de rat na eenzijdige castratie, de hoge dihydrotestosteronconcentratie in de kop (40 ng/g) zagen dalen tot een waarde gelijk aan die in de staart (10 ng/g). Uit deze experimenten volgt dat de hoge dihydrotestosteronconcentratie in de epididymis afhankelijk is van de intacte verbinding tussen epididymis en de daarnaast gelegen testikel.

Deze conclusie werd bevestigd door de resultaten van metingen van de dihydrotestosteronconcentraties in de epididymis van gehypofysectomeerde ratten die met pregnenolon werden ingespoten. Bij deze dieren wordt een klein gedeelte van het ingespoten pregnenolon in de testikels omgezet in testosteron, waardoor dit orgaan groot blijft en een vrijwel normale spermatogenese houdt (Steinberger, Chowdhury, Tcholakian en Roll, 1975). Hun zaadblazen en prostaat zijn evenwel vrijwel volledig geatrofieerd (Selye, 1942; Leatham en Brent, 1943; Masson, 1946). Onlangs bleek bij deze dieren een normale testosteronconcentratie in de rete testis vloeistof gepaard te gaan met een zeer lage concentratie in het perifere bloed (Harris en Bartke, 1975).

In een door ons uitgevoerd experiment werden ratten gehypofysectomeerd en vervolgens 30 dagen lang iedere dag met een suspensie van 2 mg pregnenolon in olie inge-

spoten. Vervolgens werden deze dieren gedood en de gewichten van de zaadblaas, prostaat, rechter epididymis en rechter testikel bepaald. Bovendien werden in de linker testikel en in bloedplasma de testosteronconcentraties gemeten (tabel 3.4). Dezelfde procedure werd gevolgd bij controledieren die na hypofysectomie olie-injecties kregen en bij intacte ratten. De prostaat en

Tabel 3.4. Lichaamsgewichten, orgaangewichten en testosteronconcentraties in het perifere plasma en de testikels van intacte ratten, gehypofysectomeerde ratten en van gehypofysectomeerde ratten die met pregnenolon behandeld waren (gemiddelden \pm standaardfouten).

	intact		gehypofysectomeerd	
			olie	pregnenolon
aantal ratten	5		5	5
lichaamsgewicht (g)	356	$\pm 12^*$	278	± 9
testikelgewicht (mg)	1307	$\pm 33^*$	290	$\pm 43^*$
epididymisgewicht				
(mg)	474	$\pm 21^*$	115	$\pm 10^*$
proximale deel	221	$\pm 9^*$	53	$\pm 6^*$
distale deel	253	$\pm 14^*$	62	$\pm 4^*$
prostaatgewicht (mg)	564	$\pm 70^*$	49	$\pm 11^*$
zaadblaasgewicht (mg)	380	$\pm 56^*$	91	$\pm 12^{**}$
testosteron in				
plasma (ng/ml)	4,1	$\pm 1,5^*$	0,3	$\pm 0,2^*$
testikel (ng/g)	167,2	$\pm 75,5$	4,3	$\pm 1,3^*$

Student's t-test: $^*p < 0,005$; $^{**}p < 0,01$, ten opzichte van gehypofysectomeerde met pregnenolon behandelde ratten. Gegevens van Vreeburg, Bielska en Ooms, 1976.

de zaadblazen in de gehypofysectomeerde ratten die met pregnenolon behandeld waren, bleken aanzienlijk lichter

te zijn dan die welke in de intacte dieren gevonden werden. Ze waren evenwel zwaarder dan die van de met olie behandelde ratten. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de kleine hoeveelheid testosteron die de testikels van met pregnenolon behandelde dieren aan het bloed afgeven (Harris en Bartke, 1975), en niet van een rechtstreeks effect van pregnenolon op de zaadblazen en de prostaat. Immers, deze laatstgenoemde organen en de epididymis waren even klein in gecastreerde ratten die pregnenolon toegediend kregen als in die welke olie kregen (tabel 3.5).

Tabel 3.5. Lichaamsgewichten en orgaangewichten van ratten die na castratie gedurende 28 dagen 2 mg pregnenolon per dag kregen toegediend.

	olie	pregnenolon
aantal ratten	3	3
lichaamsgewicht (g)	336	351
epididymisgewicht (mg)	108	116
prostaatgewicht (mg)	61	60
zaadblaasgewicht (mg)	97	95

In tegenstelling tot de prostaat en de zaadblazen, bleef de epididymis in de gehypofysectomeerde dieren die met pregnenolon werden behandeld, vrij groot. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat de epididymis niet, zoals de prostaat en de zaadblazen, alleen van androgenen voorzien wordt via het bloed, maar ook via de ductuli efferentes van de aangrenzende testikel. Deze verklaring wordt gesteund door de waarneming dat in de epididymides van gehypofysectomeerde ratten die met pregnenolon behandeld waren, veel dihydrotestosteron aanwezig was (tabel 3.6). Bij deze dieren bleken de di-

hydrotestosteronconcentraties, vooral in de kop en het midden gedeelte, in verhouding tot de plasma testosteronconcentraties nog zeer aanzienlijk te zijn. Het meest

Tabel 3.6. De dihydrotestosteronconcentraties (ng/g) in verschillende delen van epididymides van intacte ratten, gehypofysectomeerde ratten en van gehypofysectomeerde ratten die met pregnenolon behandeld waren (gemiddelden \pm standaardfouten).

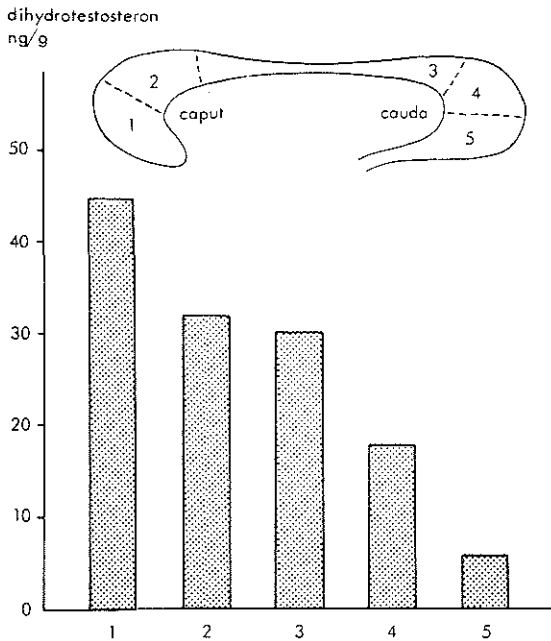
	epididymisgebied	dihydrotestosteron
intact (n=5)	caput	41,9 \pm 4,1 [*]
	corpus	15,7 \pm 3,5 ^{**}
	cauda	3,4 \pm 2,3
hypofysectomie (n=5)	caput	2,1 \pm 1,5 ^{***}
	corpus	0,5 \pm 0,4 ^{**}
	cauda	0,4 \pm 0,4
hypofysectomie en pregnenolon (n=5)	caput	12,3 \pm 6,0
	corpus	7,6 \pm 4,8
	cauda	0,8 \pm 0,8

Student's t-test: ^{*}p<0,005; ^{**}p<0,02; ^{***}p<0,01, ten opzichte van met pregnenolon behandelde ratten. Gegevens van Vreeburg, Bielska en Ooms, 1976.

verrassend was dat de spermatozoën uit de cauda van deze dieren bij kunstmatige inseminatie fertiel bleken. Hieruit volgt dat de epididymis in weerwil van zeer lage perifere testosteronconcentraties goed functioneert wanneer hij via zijn ductuli efferentes testosteron krijgt aangevoerd.

3.4. De lokalisering van dihydrotestosteron en testosteron in de epididymis

Uit het voorgaande is gebleken dat androgenen de epididymis zowel vanuit het perifere bloed als door de ductuli efferentes kunnen binnendringen en dat wanneer de epididymis alleen via het perifere bloed van androgenen wordt voorzien, de karakteristieke dihydrotestosteronverdeling met meer dihydrotestosteron in kop dan staart, verdwijnt (tabel 3.3). Met het doel de dihydrotestosteronverdeling wat gedetailleerder te leren kennen, werd de epididymis in 5 gelijke delen verdeeld en werd de dihydrotestosteronconcentratie in deze stukken bepaald (figuur 3.4).



Figuur 3.4. De dihydrotestosteronconcentraties in 5 gebieden van de epididymis van de rat (gemiddelden van 2 experimenten).

Figuur 3.4 laat zien dat de dihydrotestosteronconcentratie lager wordt in de verder van de testikel gelegen delen. Of dit ook bij andere diersoorten het geval is, is onbekend. Zo worden bij de stier de hoogste dihydrotestosteronwaarden gevonden in het distale gedeelte van de kop (Aafjes en Vreeburg, 1972) of het midden van het corpus (Ganjam en Amann, 1976).

In hoofdstuk 2 is gesteld dat de rijping en opslag van spermatozoën tot stand komt onder invloed van de in de luminale vloeistof aanwezige stoffen. Het lag dus voor de hand een onderzoek te verrichten naar de androgeenconcentraties in deze vloeistof. Omdat het ons niet mogelijk bleek om met een fijne glascapillair voldoende vloeistof uit het lumen te halen, werd een indirecte methode gevolgd om epididymisvloeistof te verkrijgen. Met dit doel werd de epididymis in 2 gelijke delen (proximaal en distaal gebied) verdeeld, waarna de delen apart met een fijn scherp schaarje in ongeveer 20 kleinere stukjes verdeeld werden. Deze stukjes werden vervolgens in 10 ml koude (4°C) Hank's oplossing gedurende 20 seconden met een magnetisch roerstaafje geroerd. Na 20 seconden bleek al meer dan 1/3 van het totale aantal spermatozoën uit het weefsel gewassen en in de oplossing te zijn. Wanneer we aannemen dat verhoudingsgewijs net zo veel van de spermatozoën als van de luminale vloeistof worden uitgewassen, dan kan met het aantal in het weefsel achtergebleven spermatozoën, het percentage uitgewassen (en achtergebleven) luminale vloeistof berekend worden. De stukjes weefsel werden gescheiden van de uitgewassen luminale vloeistof en de spermatozoën, door de oplossing te zeven. Met de uitgezeefde stukjes werd de wasprocedure herhaald, met één wijziging, dat nu in plaats van 20 seconden, 5 minuten werd geroerd. De stukjes weefsel werden vervolgens gehomogeniseerd, waarna zowel in het homogenaat (fractie 3) als in de beide wasfracties (fracties 1 en 2), het aantal spermatozoën werd bepaald.

De 2 wasfracties werden daarna 10 minuten bij 2000 g afgecentrifugeerd, om losgeraakte cellen en stukjes weefsel uit de verdunde luminale vloeistof te verwijderen. De 2 neerslagen werden bij het homogenaat gevoegd. In de 3 fracties die op deze wijze werden verkregen werden de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties bepaald. In tabel 3.7 zijn het aantal spermatozoën dat in de 3 fracties aangetroffen werd en de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties per 10^8 spermatozoën, weergegeven.

Tabel 3.7. Het aantal spermatozoën (miljoenen) in de fracties 1, 2 en 3 van de proximale en distale epididymides van 3 ratten, en de concentraties ($\text{ng}/10^8$ spermatozoën) van testosteron en dihydrotestosteron in fracties 1 en 2 (gemiddelden \pm standaardfouten van 4 experimenten).

	fractie	spermatozoën	testosteron	dihydrotestosteron
proximale gebied	1	130 \pm 43	0,8 \pm 0,3	8,4 \pm 3,2
	2	86 \pm 28	0,7 \pm 0,3	9,4 \pm 3,8
	3	116 \pm 43	-	-
distale gebied	1	326 \pm 144	0,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,3
	2	436 \pm 38	0,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1
	3	206 \pm 23	-	-

Gegevens van Vreeburg, 1975.

Uit het aantal in het weefsel achtergebleven spermatozoën kan met de in tabel 3.7 gegeven getallen de hoeveelheid in het lumen achtergebleven testosteron en dihydrotestosteron berekend worden. Door dit getal af te trekken van de hoeveelheid androgeen in de uitgewassen stukjes weefsel, is het aantal ng testosteron en di-

hydrotestosteron dat zich in het cellulaire materiaal bevindt bekend. Bij deze berekening is ervan uitgegaan dat lymfe, bloedplasma en interstitiële vloeistof een verwaarloosbare hoeveelheid androgenen bevatten. In tabel 3.8 is het resultaat van deze berekening weergegeven.

Tabel 3.8. De hoeveelheid (ng) testosteron en dihydrotestosteron in de luminale vloeistof en het cellulaire materiaal dat zich in 1 g epididymisweefsel bevindt (gemiddelden + standaardfouten van 4 experimenten).

		luminale vloeistof	cellulair materiaal
proximale gebied	testosteron	2,0 ± 0,5	0,6 ± 0,6
	dihydrotestosteron	20,5 ± 7,8	9,7 ± 4,6
distale gebied	testosteron	1,2 ± 1,0	0,5 ± 0,6
	dihydrotestosteron	2,8 ± 0,9	5,8 ± 1,5

Gegevens van Vreeburg, 1975.

In het proximale deel van de epididymis blijkt meer dan 60% van de totale hoeveelheid dihydrotestosteron in de luminale vloeistof aanwezig te zijn; in het distale deel ongeveer 30%. Om een indruk te krijgen over de hoeveelheid luminale vloeistof in de epididymis, is een histologisch preparaat met een projectiemicroscop vergroot afgebeeld en nagetekend. Door de lumina uit te knippen en te wegen, werd het volume van de luminale vloeistof met de daarin aanwezige spermatozoën in één gram proximaal epididymisweefsel op 0,5 ml en in één gram distaal epididymisweefsel op 0,6 ml geschat. Het volume dat de spermatozoën in beslag nemen is gering. Zelfs in de cauda, waar per gram weefsel 600 miljoen

spermatozoën voorkomen, is dit niet meer dan 7% van het volume van de luminale vloeistof (volume van 1 spermatozoën is $70 \mu\text{m}^3$; Brotherton, 1975).

Uit het bovenstaande volgt dat de concentratie van dihydrotestosteron in de luminale vloeistof van het proximale gedeelte ongeveer 40 ng/ml bedraagt. In het distale gedeelte is dat ongeveer 5 ng/ml. In tabel 3.9 zijn de testosteron- en dihydrotestosteronconcentraties in de luminale vloeistof van de epididymis van de rat en enkele andere diersoorten weergegeven.

Tabel 3.9. De concentraties van testosteron en dihydrotestosteron (ng/ml of ng/mg luminaal eiwit) in de luminale vloeistof van de epididymis van de rat, ram en stier.

	herkomst vloeistof	testosteron	dihydrotestosteron
rat ¹	proximale gebied	4	41
	distale gebied	2	5
rat ²	caput	0,13 ng/mg eiwit	0,51 ng/mg eiwit
	cauda	0,06 ng/mg eiwit	0,18 ng/mg eiwit
ram ³	caput	24,8	-
	cauda	10,8	-
ram ⁴	cauda	2,58 \pm 0,86	16,93 \pm 4,97
stier ⁵	cauda	11,46 \pm 0,71	20,25 \pm 1,08

Gegevens van: ¹Vreeburg, 1975; ²Pujol, Bayard, Louvet en Boulard, 1976; ³White en Hudson, 1968; ⁴Voglmayr, Musto, Saksena, Brown-Woodman, Marley en White, 1977; ⁵Ganjam en Amann, 1976.

Uit de beschikbare gegevens blijkt dat hoge concentraties androgenen aanwezig zijn in de luminale vloeistof van de epididymis en dat deze concentraties groter

zijn in de kop dan in de staart. Pujol et al. (1976) zijn de enigen die soortgelijk onderzoek bij de rat hebben uitgevoerd. Zij hebben de steroidconcentraties uitgedrukt in ng per mg eiwit dat in de luminale vloeistof werd aangetroffen. De luminale vloeistof in de cauda van de rat bevat 38 mg eiwit per ml; per ml vloeistof zou dus 2 ng testosteron en 6 ng dihydrotestosteron aanwezig moeten zijn. Wanneer we aannemen dat in de caput dezelfde eiwitconcentratie voorkomt, dan zou de dihydrotestosteronconcentratie daar 19 ng/ml en de testosteronconcentratie 5 ng/ml zijn. Uit het bovenstaande blijkt dat spermatozoën tijdens hun verblijf in de epididymis blootgesteld worden aan hoge concentraties androgenen. Onlangs is ook op andere wijze waarschijnlijk gemaakt dat androgenen in de luminale vloeistof van de epididymis van de rat voorkomen; 60 minuten na toediening van ³H-testosteron aan gecastreerde ratten werd meer radioactiviteit in de luminale vloeistof dan in het weefsel gevonden. Het extraheerbare gedeelte van deze radioactiviteit bleek voor 73% uit dihydrotestosteron te bestaan, terwijl testosteron niet in het lumen werd gevonden (Back, 1975).

3.5. De concentratie van dihydrotestosteron en de aanwezigheid van androgeenbindende transport-eiwitten in de epididymis

Vrijwel te zelfder tijd dat door ons hoge androgeen concentraties in de epididymis werden aangetroffen, werd een androgeenbindend transport-eiwit (ABP) in het lumen van dit orgaan aangetoond (Ritzén, Nayfeh, French en Dobbins, 1971; Hansson, Djøseland, Reusch, Attramadal en Torgersen, 1973). De hoeveelheid ABP die in één gram epididymisweefsel voorkomt, is voldoende om 20 ng (Ritzén et al., 1971) tot 34 ng (Hansson, 1972) testosteron of dihydrotestosteron te binden. Het ABP bindt dihydro-

testosteron met een 2,5 maal grotere affiniteit dan testosteron (French en Ritzén, 1973a). Deze eigenschappen en de hoge 5α -steroidreductase activiteit in het omringende epididymisweefsel (hoofdstuk 4) zijn er waarschijnlijk de oorzaak van dat de dihydrotestosteronconcentratie in het lumen van de epididymis bijzonder hoog is.

De opvatting dat de aanwezigheid van ABP de grote hoeveelheid dihydrotestosteron in de epididymis veroorzaakt, wordt gesteund door het identieke gedrag van ABP en dihydrotestosteron na afbinding van de ductuli efferentes. Na deze ingreep verdwijnt het ABP binnen enkele dagen uit het lumen van de epididymis (French en Ritzén, 1973b) en daalt de androgeenconcentratie. Deze daling vindt voornamelijk plaats in het proximale gebied waar de hoogste ABP- (French, McLean, Smith, Tindall, Weddington, Petrusz, Nayfeh en Ritzén, 1974) en dihydrotestosteronconcentraties voorkomen. Een week na afbinding is de dihydrotestosteronconcentratie in de kop gelijk geworden aan die in de staart en bedraagt dan ongeveer 10 ng per gram weefsel. Deze hoeveelheid bevindt zich waarschijnlijk voor het grootste gedeelte in de epididymiscellen omdat het ABP uit het lumen verdwenen is.

Per dag komt een grote hoeveelheid androgenen aan het ABP gebonden de epididymis binnen. De fysiologische betekenis van de androgenen die in de epididymis zelf aan ABP gebonden zijn, is onduidelijk omdat androgenen gebonden aan eiwitten biologisch niet actief zijn (Lasnitzki en Franklin, 1975). Wellicht houdt het aan ABP gebonden dihydrotestosteron de concentratie van dit androgeen in de epididymis constant bij sterk wisselende perifere testosteronconcentraties (Bartke, Steele, Musto en Calwell, 1973); deze mogelijkheid is onlangs besproken in verband met de betekenis van ABP voor de testikelfunctie (Rommerts, Grootegoed en Van der Molen, 1976). Een andere mogelijke functie van het ABP zou

kunnen berusten op het feit dat het ABP tijdens zijn gang door het lumen van de epididymis geleidelijk verdwijnt, of zijn androgeenbindende eigenschappen verliest. De wijze waarop dit gebeurt is onbekend. Wanneer we evenwel aannemen dat in de vloeistofstroom die zich in de richting van het ductus deferens beweegt androgeenbindende moleculen denatureren, dan gaan ten gevolge hiervan op ieder moment dihydrotestosteronmoleculen van de gebonden in de vrije, biologisch actieve toestand over. Op deze wijze komt per dag in het lumen van de epididymis zo'n 20 ng dihydrotestosteron vrij. In werkelijkheid zou dus niet zozeer de aanwezigheid van het ABP zelf, als wel zijn verdwijning van belang zijn voor de androgeenvoorziening in de epididymis.

3.6. Samenvatting

In de epididymis van de rat is de concentratie van dihydrotestosteron veel hoger dan de concentratie van testosteron. De hoogste dihydrotestosteronconcentratie in de epididymis werd aangetroffen in het proximale deel, waar bijzonder veel dihydrotestosteron in de lumenale vloeistof aanwezig is. De concentratie van testosteron en dihydrotestosteron in de epididymis wordt zowel beïnvloed door testosteron dat met het perifere bloed wordt aangevoerd, als door testosteron dat via de ductuli efferentes het lumen van dit orgaan binnenkomt.

HOOFDSTUK 4

DE REGULATIE VAN DE EPIDIDYMISFUNCTIE DOOR ANDROGENEN

4.1. *Inleiding*

De ontwikkeling en de instandhouding van het fertiliserend vermogen van de spermatozoën in de epididymis is afhankelijk van androgenen (hoofdstuk 2). De hoge dihydrotestosteronconcentratie in de epididymis en zijn grote androgeniciteit (hoofdstuk 1) maken het verleidelijk dit steroid te beschouwen als het biologisch actieve androgeen in de epididymis. In dit hoofdstuk zullen een aantal andere argumenten worden besproken, die erop wijzen dat dit inderdaad het geval is.

4.2. *Het testosteronmetabolisme in de epididymis*

Testosteron is kwantitatief het belangrijkste androgeen dat de epididymis van de rat via het perifere bloed en de ductuli efferentes bereikt (hoofdstuk 3). Niettemin worden in dit orgaan zelf hogere concentraties van dihydrotestosteron dan van testosteron aangetroffen. Bij de rat is met uitzondering van de twee zojuist genoemde steroiden en van 3α -androstaandiol (dat in onmeetbaar lage concentraties in de epididymis voorkomt; Calandra, Podestá, Rivarola en Blaquier, 1974) van geen enkel ander androgeen de concentratie in de epididymis bekend. Wel is onderzocht welke metaboliëten in dit orgaan uit testosteron kunnen ontstaan. Na inspuiting van radioactief gemerkt testosteron bij gecastreerde ratten werden een aantal verschillende androgenen in de epididymis aangetroffen (tabel 4.1; Djøseland, Hansson en Haugen, 1973). Dezelfde steroiden werden ook gevonden

na incubaties van homogenaten op plakjes weefsel met testosteron (Djøseland, Hansson en Haugen, 1974). Uit de gegevens in tabel 4.1 blijkt dat dihydrotestosteron en 3 α -androstaandiol in de grootste hoeveelheden gevormd worden.

Tabel 4.1. Radioactieve steroïden in de epididymis van de rat, 30 minuten na een intramusculaire injectie van ^3H -testosteron of na een 2 uur durende incubatie van plakjes weefsel met ^3H -testosteron.

steroid*	% in epididymis na	
	inspuiting	incubatie
testosteron	8,9	10,4
dihydrotestosteron	47,2	39,3
3 α -androstaandiol	20,8	22,7
3 β -androstaandiol	4,4	4,6
androsteendion	2,7	6,2
androstaandion	6,5	7,3
androsteron	3,4	8,9
polaire metabolieten	6,4	0,4
totaal	100,3	99,8

*Alleen de in ether oplosbare steroïden werden opgewerkt. Gegevens van Djøseland, Hansson en Haugen, 1973, 1974.

De aanwezigheid van spermatozoën in de epididymis bleek geen meetbaar effect te hebben op het steroïdmetabolisme. Tijdens incubaties van epididymisweefsel van gecastreerde ratten die met testosteron behandeld waren, werd dit androgeen op dezelfde wijze omgezet als bij intacte dieren gevonden was (Djøseland, 1976). Zelf heb-

ben wij waargenomen dat spermatozoën geïsoleerd uit de ratte-epididymis niet in staat waren, testosteron om te zetten in dihydrotestosteron (Vreeburg en Scholte, 1973). Dezelfde negatieve waarneming is bij stieren-spermatozoën gedaan (Hammerstedt en Amann, 1976). Wel was de omzetting van androsteendion naar androstaandion met deze spermatozoën aantoonbaar. Voor zover mij bekend is de omzetting van testosteron naar oestradiol in de epididymis bevestigd noch ontkend.

4.3. *Effecten van testosteronmetabolieten op de epididymisfunctie*

Na castratie kan de epididymis blijven functioneren wanneer testosteron wordt ingespoten (hoofdstuk 2). Ook is bekend dat in dit orgaan uit testosteron een aantal metabolieten worden gevormd die in bioassays biologisch actief zijn (hoofdstuk 1). Dit zou kunnen betekenen dat testosteron slechts een 'prehormoon' is, dat zijn werking alleen effectief verricht na omzetting in biologisch actieve metabolieten. Bij de bestudering van de biologische effecten van androgenen na inspuiting moet bedacht worden dat omzettingen van dihydrotestosteron naar testosteron (McGuire, Hollis en Tomkins, 1960; Shimazaki, Horaguchi, Ohki en Shida, 1971; Robel et al., 1971) en van 3β -androstaandiol naar dihydrotestosteron (Levy, Marchut, Baulieu en Robel, 1974) kwantitatief verwaarloosbaar zijn. Hieruit volgt dat na toediening van 3β -androstaandiol vrijwel uitsluitend 3β -androstaandiol effecten worden gezien en dat na inspuiting van dihydrotestosteron de waargenomen effecten veroorzaakt kunnen worden door verschillende 5α -gereduceerde androstanen, maar niet door testosteron.

4.3.1. *Effecten van androgenen op het behoud van het fertiliserend*

vermogen van spermatozoën in de epididymis

In ons onderzoek hebben wij ons beperkt tot de vraag of dihydrotestosteron het fertiliserend vermogen van spermatozoën in de staart van de epididymis zou kunnen onderhouden. Met dit doel werd de fertiliteit van gecastreerde ratten onderzocht na inspuiting van testosteron en dihydrotestosteron. Seksueel ervaren ratten werden in 3 groepen verdeeld (groepen 1, 2 en 3). Bij groep 1 werden aan beide zijden de ductuli efferentes van de testikels afgebonden. Bij de groepen 2 en 3 werd een castratie uitgevoerd. Bovendien werd in alle 3 de groepen aan beide zijden een ligatuur aangebracht op het midden van de epididymis. Na operatie werd groep 1 dagelijks ingespoten met olie, groep 2 met 200 µg testosteronpropionaat en groep 3 met 200 µg dihydrotestosteronpropionaat. Omdat al binnen 4 dagen na castratie spermatozoën in de epididymis onvruchtbaar worden (Dyson en Orgebin-Crist, 1973), werd geen gecastreerde controle groep meegenomen. Op verschillende tijden na het begin van het experiment werden de ratten bij een vrouwelijke rat in proestrus gebracht, hetgeen in alle gevallen leidde tot paring. De dag na de paring werden de mannetjes gedood en hun prostaatgewichten bepaald. Hun fertiliteit werd vastgesteld door bij de door hen gedekte dieren het aantal jongen bij de geboorte te tellen (tabel 4.2).

In alle 3 de groepen werden de ratten tussen de 28 en 32 dagen onvruchtbaar. De prostaatgewichten in groepen 1, 2 en 3 waren nagenoeg gelijk (tabel 4.3), waaruit volgt dat een fysiologische hoeveelheid testosteronpropionaat en dihydrotestosteronpropionaat was ingespoten. Om zeker te zijn dat het verdwijnen van de fertiliteit niet werd veroorzaakt door te kleine aantallen spermatozoën bij de ejaculatie op dag 32, werd bij 4 ratten (behandeling als in groep 1) het aantal spermatozoën geteld

Tabel 4.2. De invloed van testosteronpropionaat (groep 2) en dihydrotestosteronpropionaat (groep 3) op de vruchtbaarheid van ratten, bij welke de testikels wel en de epididymides niet verwijderd waren. Bij groep 1 waren alleen de ductuli efferentes afgebonden.

dagen na begin behandeling	aantal vruchtbare ratten			gemiddeld* aantal jongen		
	groep 1	groep 2	groep 3	groep 1	groep 2	groep 3
16	3/4**	3/4	5/8	8,3	10,3	9,3
20	3/4	3/4	7/8	10,0	9,3	9,3
24	2/4	3/4	5/7	5,5	8,0	9,4
28	2/4	3/3	3/4	7,5	6,7	5,7
32	0/4	0/4	0/7	-	-	-

* Gemiddelden bij de vruchtbare dieren.

** Aantal dieren per groep.

dat op dag 32 in de linker en rechter staart van de epididymis aanwezig was. Dit aantal bleek tussen 86 en 121 miljoen te liggen. Vier andere ratten die op dag 32 gepaard hadden, hadden op dag 33 gemiddeld nog maar 0,6

Tabel 4.3. Het gemiddelde lichaamsgewicht (g) en prostaatgewicht (mg) op dag 16 en dag 32 na het begin van de behandeling. Bij groep 1 werden de ductuli efferentes afgebonden. Groep 2 kreeg na castratie testosteronpropionaat, groep 3 dihydrotestosteronpropionaat toegediend.

dag	lichaamsgewicht			prostaatgewicht		
	groep 1	groep 2	groep 3	groep 1	groep 2	groep 3
16	300	319	331	488	538	587
32	370	349	396	469	511	453

miljoen spermatozoën in hun epididymides. Tweeëndertig dagen na het begin van de behandeling werden dus 100 miljoen spermatozoën uitgestoten. Dit aantal is ruim voldoende voor een succesvolle bevruchting; Aafjes en Vels (persoonlijke mededeling) hebben in 1977 waargenomen dat ratten met minder dan 1 miljoen spermatozoën in de epididymis nog fertiel waren. Uit het bovenstaande blijkt dat met dihydrotestosteron en/of de daaruit gevormde metabolieten de vruchtbaarheid van spermatozoën in de staart van de epididymis even lang in stand blijft als met testosteron of met de androgenen, die door de testikels geproduceerd worden.

Bij de hamster is door Lubicz-Nawrocki (1973) onderzocht, hoeveel testosteron, dihydrotestosteron, 3α -androstaandiol of 3β -androstaandiol nodig is om het fertiliserend vermogen van spermatozoën in stand te houden. Zij vond dat dagelijks minstens 100 μg testosteron, 75 μg dihydrotestosteron of 12,5 μg 3α -androstaandiol ingespoten moest worden om de fertiliteit in stand te houden; 3β -androstaandiol was vrijwel onwerkzaam. Opmerkelijk was dat bij deze hamsters de fructoseproductie door de zaadblazen veel sterker door testosteron en dihydrotestosteron gestimuleerd werd dan door 3α -androstaandiol. Op grond hiervan stelde Lubicz-Nawrocki dat voor het functioneren van de cauda van de epididymis andere androgenen nodig zijn dan voor de zaadblazen en dat de instandhouding van het fertiliserend vermogen van de spermatozoën afhankelijk is van de omzetting van dihydrotestosteron tot het in dit orgaan meer potente androgeen 3α -androstaandiol.

4.3.2. *Effecten van androgenen op de rijping van spermatozoën in de epididymis*

De bovenbeschreven *in vivo* experimenten hebben het

nadeel dat het biologisch effect dat door een bepaald androgeen veroorzaakt wordt, in belangrijke mate bepaald wordt door de manier waarop het wordt toegediend, en door het perifere metabolisme. Bij stukjes weefsel in een kweekmedium, waaraan androgenen zijn toegevoegd, gelden deze genoemde bezwaren niet. Met gebruik van deze techniek toonden Orgebin-Crist, Danzo en Davies (1977) bij het konijn aan, dat als testosteron of dihydrotestosteron aan het kweekmedium worden toegevoegd, spermatozoën in een tubulus geïsoleerd uit het proximale gedeelte van het corpus epididymidis rijpen. In andere experimenten werden naast de effecten van testosteron en dihydrotestosteron ook die van 3α -androstaandiol en 3β -androstaandiol op de histologie van de tubulus onderzocht (Hoffman, Jahad en Orgebin-Crist, 1976). De structuur van het weefsel en de cellen bleef het best bewaard wanneer aan het kweekmedium dihydrotestosteron of 3α -androstaandiol was toegevoegd. Testosteron voldeed minder, terwijl 3β -androstaandiol vrijwel geen effect teweegbracht. Merkwaardig is dat, wanneer 3α -androstaandiol bij konijnen wordt ingespoten, de epididymis nauwelijks reageert (Jones, 1977).

Op dit moment zijn er geen gegevens over de rijping van spermatozoën bij de rat onder invloed van 5α -gereduceerde testosteronmetabolieten. Zelf hebben wij gevonden dat 4 intacte ratten die dagelijks 300 μ g dihydrotestosteronpropionaat toegediend kregen, 35 dagen na het begin van de behandeling vruchtbaar waren. Het staat vast dat bij deze dieren de gonadotrofinenconcentratie in het plasma (hoofdstuk 6) en daardoor de testikulaire secretie van androgenen buitengewoon klein moet zijn geweest. Aangezien de maximale levensduur van rijpe spermatozoën minder dan 32 dagen is, stammen de jongen af van spermatozoën die gerijpt waren onder invloed van dihydrotestosteron en/of zijn metabolieten.

4.4. Androgeenbinding in de epididymis

In de epididymis van de rat komen 2 androgeenbindende eiwitten voor die beide met een hoge affiniteit testosteron en dihydrotestosteron kunnen binden. Eén van deze eiwitten, het ABP, is gelokaliseerd in het lumen van de epididymis en heeft het vermogen grote hoeveelheden testosteron en dihydrotestosteron in het lumen te concentreren (hoofdstuk 3).

Het andere androgeenbindende eiwit dat in de epididymis is aangetoond, de androgeenreceptor, bleek wat betreft zijn fysisch-chemische eigenschappen vergelijkbaar te zijn met de androgeenreceptor in de prostaat (Tindall, Hansson, McLean, Ritzén, Nayfeh en French, 1975). De affiniteit van de androgeenreceptor in de epididymis voor dihydrotestosteron is iets groter dan de affiniteit voor testosteron (Wilson en French, 1976). In competitie experimenten met testosteron of dihydrotestosteron werden andere steroïden, zoals 3α -androstaandiol, veel slechter gebonden dan de twee zojuist genoemde androgenen.

Ondanks de kleine affiniteitsverschillen van de receptor voor testosteron en dihydrotestosteron bleek 3 uur na inspuiting van radioactief testosteron bij gehy-pofysectomeerde ratten dihydrotestosteron het enige steroïd te zijn, dat aan de receptor in het cytoplasma gebonden was (Tindall et al., 1975). De hoeveelheid receptormoleculen die zich op dit tijdstip na toediening van radioactief testosteron in het cytoplasma van de epididymiscellen bevond was evenwel gering, omdat de beladen receptormoleculen zich van het cytosol naar de kern verplaatsten (Tindall, French en Nayfeh, 1972). Bij analyse van de aard van de radioactiviteit die in de kernen aanwezig was, bleek het grootste deel uit dihydrotestosteron te bestaan. Zo was één uur na inspuiting van radioactief testosteron 70% van de radioactiviteit

in de celkernen dihydrotestosteron. Dit percentage nam toe tot meer dan 90%, 5 uur na inspuiting.

Ook na incubaties van stukjes epididymisweefsel met testosteron, was dihydrotestosteron in een hoog percentage (59%) in de kern aanwezig (Blaquier en Calandra, 1973). In de kernen bleek een gedeelte aan receptoren gebonden te zijn, terwijl een ander gedeelte vrij was. De aan receptor-eiwitten gebonden steroïden bestonden voor 75% uit dihydrotestosteron en voor 24% uit testosteron. Van de zogenaamde vrije steroid fractie (42% van alle radioactiviteit) bleek 52% uit dihydrotestosteron, 8% uit testosteron en 40% uit androstaandiol te bestaan.

Bij een recent onderzoek (Baker, Bailey, Feil, Jefferson, Santen en Bardin, 1977), waarin een perfusie van de tractus genitalis van de rat met radioactief testosteron werd uitgevoerd, bleek meer dan 90% van de specifiek aan de kern gebonden androgenen uit dihydrotestosteron te bestaan. De kleine hoeveelheid testosteron in de kern, was niet aan receptoren gebonden.

Bovengenoemde resultaten laten zien dat na toediening van radioactief testosteron vrijwel alle receptor-gebonden radioactiviteit in het cytoplasma en de kern uit dihydrotestosteron bestaat.

4.5. *Discussie*

Uit de beschikbare gegevens blijkt dat de rijping en opslag van spermatozoën in de epididymis van de rat in stand gehouden kan worden door 5α -gereduceerde metabolieten van testosteron. Bij de hamster (na inspuiting) en het konijn (in weefselkweek) bleek 3β -androstaandiol onwerkzaam, terwijl 3α -androstaandiol net zo actief of zelfs actiever was dan dihydrotestosteron. Toch volgt hier niet uit dat 3α -androstaandiol ook intracellulair

het actieve androgeen is, omdat er aanwijzingen zijn dat de biologische activiteit van 3α -androstaandiol in een aantal gevallen ontstaat door omzetting van dit androgeen in dihydrotestosteron. Zo bleek na inspuiting van radioactief 3α -androstaandiol bij gecastreerde ratten, dihydrotestosteron het enige androgeen te zijn dat in de celkernen van de epididymis aangetoond kon worden (Djøseland, Hastings en Hansson, 1976). Onlangs is aangetoond dat bij de rat het effect van inspuiting van dihydrotestosteron of van androstaandiol op de testikel een betere correlatie vertoont met de concentratie van dihydrotestosteron in dit orgaan, dan met de concentratie van androstaandiol (Purvis, Calandra, Haug en Hansson, 1977). Deze onderzoekers kwamen tot de conclusie dat androstaandiol zijn werking in de testikel verricht na omzetting in dihydrotestosteron. Het sterke verschil in effect van 3α -androstaandiol op de functie van prostaat en epididymis, zoals door Jones (1977) bij het konijn gevonden werd, zou daarom kunnen berusten op verschillen in de vorming van dihydrotestosteron in deze weefsels.

De fysiologische en biochemische gegevens die in dit en het voorafgaande hoofdstuk zijn vermeld, wijzen erop dat in de epididymis van de rat dihydrotestosteron het belangrijkste androgeen is. De vraag of de omzetting van testosteron naar dihydrotestosteron essentieel is voor het functioneren van de epididymis, is moeilijker te beantwoorden. Tot nu toe is pas voor één androgeengevoelig weefsel aangetoond dat de vorming van dihydrotestosteron noodzakelijk is (Voigt en Hsia, 1973). De hamster heeft op zijn flanken een talgklier, die groeit en donker kleurt onder invloed van zowel testosteron als van dihydrotestosteron. Wanneer in dit orgaan de omzetting van testosteron naar dihydrotestosteron met 4-androsteen-3-one- 17β -carbonzuur wordt geremd, dan verdwijnt hiermee de werkzaamheid van testosteron. Dihydrotestosteron blijft daarentegen in aanwezigheid

van deze stof actief. Kristallen van 4-androsteendion-3-one-17 β -carbonzuur die door ons in de epididymis van intacte ratten werden geïmplanteerd, veroorzaakten helaas geen afname in de dihydrotestosteronconcentratie in dit orgaan.

Hoewel dus in sommige organen de dihydrotestosteronvorming nodig kan zijn, is dat in andere waarschijnlijk niet het geval. Zo is in een spier als de levator ani de omzetting van testosteron naar dihydrotestosteron bijzonder klein, en zou de groei die na toediening van testosteron optreedt, alleen door testosteron zelf veroorzaakt worden (Krieg en Voigt, 1977).

HOOFDSTUK 5

HERSENEN EN TESTIKELHORMONEN

5.1. *Hersenen en testikelactiviteit*

Een groot aantal zoogdieren en vogels plant zich maar gedurende een beperkt gedeelte van het jaar voort: "Die vogels die maar gedurende één seizoen per jaar copuleren, hebben wanneer deze periode voorbij is, zulke kleine testikels, dat deze haast niet te zien zijn; tijdens het voortplantingsseizoen zijn zij heel groot (Aristoteles, 384-322 v. Chr.). Bij bepaalde vogels en zoogdieren, als de veldmuis, de fret, de kat en het schaap, veroorzaken een paar uur extra verlichting in de donkere periode van het jaar, een groei van de testikels (Harris, 1955). Onze voorouders maakten van dit verschijnsel gebruik bij de vogelvangst. Door zangvogels vanaf mei tot augustus aan minder licht bloot te stellen en vervolgens de hoeveelheid licht weer op te voeren, kregen zij in september en oktober vogels, die door hun fraaie liedjes anderen in de val lokten (Damsté, 1947).

De effecten die uitwendige omstandigheden kunnen hebben op de activiteit van de gonade, leidden tot de gedachte dat het centrale zenuwstelsel de activiteit van de gonade reguleert. Dit idee werd voor het eerst in 1936 getoetst in studies, waarin bij het konijn na een diffuse elektrische stimulatie van de hersenen ovulatie optrad (Marshall en Verney). In 1937 vond Harris dat stimulatie van de hypothalamus het meest effectief was voor het opwekken van ovulaties. Inmiddels weten we nu dat de hypothalamus zelf een endocrien weefsel is, dat door afscheiding van kleine peptiden in bloedvaten die

rechtstreeks naar de hypofyse lopen, de activiteit van dit orgaan reguleert.

5.2. *Testikels en hersenactiviteit*

Toen Harris in 1937 zijn experimenten uitvoerde, was al enige tijd bekend dat de hypofyse de testikels kon aanzetten tot produktie van spermatozoën en hormonen. Moore en Price (1932) hadden inmiddels geconcludeerd dat de activiteit van de hypofyse weer beïnvloed wordt door de secretieprodukten van de gonaden; dit zou plaatsvinden doordat de secretie van gonade-aanzettende hormonen (gonadotrofinen) door de hypofyse meer geremd wordt naarmate de concentratie van geslachtshormonen in het bloed hoger wordt. Volgens de huidige opvattingen komt de terugkoppelende werking van gonadehormonen tot stand door beïnvloeding van zowel de hypofyse als de hypothalamus en hoger gelegen hersengebieden.

Naast effecten op de secretie van gonadotrofinen, hebben de geslachtshormonen ook effecten op het gedrag. Het eerste experiment waarin een verband tussen de aanwezigheid van testikels en bepaalde gedragingen werd aangetoond, is het al in hoofdstuk 1 vermelde experiment van Berthold (1849). Deze onderzoeker nam waar dat hanen na castratie niet meer kraaiden, vochten of copuleerden. Kregen de hanen direct na castratie testikels geïmplanteerd, dan bleef het hanige gedrag bestaan. Recent is het experiment van Berthold door Barfield (1969) in gewijzigde vorm herhaald. Deze onderzoeker beschrijft hoe bij gecastreerde hanen het paringsgedrag terugkeert na implantatie van testosteron in de hypothalamus; bepaalde gedragingen treden dus alleen maar op wanneer er androgenen in de hersenen aanwezig zijn. Op dit moment staat vast, dat bij veel mannelijke dieren niet alleen het paringsgedrag maar ook andere gedragin-

gen die niet rechtstreeks bij de voortplanting betrokken zijn, beïnvloed worden door androgenen. Om een enkel voorbeeld te geven, door Cochran en Perachio (1977) is waargenomen dat in een groep van 3 mannelijke resus-ape- waarin na castratie de hiërarchie niet veranderde, de aap met rangnummer 2 die als enige in de groep met dihydrotestosteronpropionaat werd behandeld, het meest dominerende dier werd. Dit kwam tot uiting in het aantal malen dat deze aap een agressieve houding tegenover de andere twee aannam en de frequentie waarmee hij zelf bedreigd werd. Bij lagere dieren, met name de muis, is er een zeer duidelijk effect van androgenen op agressief gedrag (Owen, Peters en Bronson, 1974).

5.3. Effecten van geslachtshormonen op de vroege ontwikkeling van de hersenen

In 1934 nam Goodman waar, dat geen ovulaties optraden in een ovarium dat getransplanteerd werd onder het nierkapsel van een gecastreerde mannelijke rat. Dit was wel het geval als een ovarium op dezelfde wijze bij een vrouwelijke rat geïmplantteerd werd. Wanneer de mannelijke ratten evenwel direct na de geboorte gecastreerd werden, dan kwamen er wel ovulaties voor in de op volwassen leeftijd geïmplantteerde ovaria (Pfeiffer, 1936). Bovendien bleken deze dieren seksuele gedragingen te vertonen die gewoonlijk vrijwel uitsluitend bij vrouwelijke ratten voorkomen (Harris, 1964; Young, Goy en Phoenix, 1964). Uit de vele experimenten die in de loop der tijd zijn uitgevoerd is vast komen te staan dat bij ratten de ontwikkeling van die hersengebieden die betrokken zijn bij de cyclische uitscheiding van gonadotrofinen en die welke het paringsgedrag reguleren, in mannelijke richting verloopt onder invloed van testosteron dat tijdens een vroege fase van hersenontwikkeling door

de testikel geproduceerd wordt.

De opvatting dat in perifere androgeen-afhankelijke organen, zoals de prostaat, niet testosteron maar dihydrotestosteron het actieve androgeen is (hoofdstuk 1), leidde tot een reeks onderzoekingen naar het metabolisme van testosteron en de binding van zijn metabolieten in hersenweefsel.

5.4. Het testosteronmetabolisme in hersenweefsel

Testosteron kan in hersenweefsel omgezet worden in zowel 5α -gereduceerde androstanen als oestrogenen.

De omzetting van testosteron in dihydrotestosteron werd voor het eerst in 1969 aangetoond in plakjes en homogenaten van hersenweefsel (Jaffe, 1969; Sholiton en Werk, 1969). Zoals ook in alle andere androgeengevoelige weefsels, bleek een gedeelte van het gevormde dihydrotestosteron omgezet te worden naar 3α -androstaandiol (Sholiton, Hall en Werk, 1970; Pérez-Palacios, Castañeda, Gómez-Pérez, Pérez en Gual, 1970; Rommerts en Van der Molen, 1971). De enzymen die voor deze zojuist genoemde omzetting nodig zijn, het 5α -steroidreductase en het 3α -hydroxy-steroidreductase, bleken aanwezig in alle hersengebieden die onderzocht werden. Denef, Magnus en McEwen (1973), die de activiteit van het 5α -steroidreductase in 13 gebieden bepaalden, vonden de hoogste 5α -steroidreductase activiteit in de tussenhersenen. Deze activiteit was ongeveer 3 maal zo hoog als in de pijnappelklier, waar hij het kleinst was. De omzetting van dihydrotestosteron naar 3β -androstaandiol bleek niet waarneembaar.

Al direct na de geboorte is bij ratten de vorming van dihydrotestosteron en 3α -androstaandiol meetbaar (Denef, Magnus en McEwen, 1974). De 5α -steroidreductase activiteit in de hypothalamus is dan ongeveer 2-3 maal zo

groot als op volwassen leeftijd.

In 1971 toonden Naftolin, Ryan en Petro aan, dat androsteendion door menselijk foetaal hersenweefsel omgezet kan worden in oestron en oestradiol. Deze vondst leidde tot onderzoek naar de aanwezigheid van de aromatiserende enzymen in hersenweefsel van andere diersoorten. Korte tijd later werd vastgesteld dat ook bij volwassen dieren zoals de resus-aap, het konijn, de rat en de muis, de hypothalamus androsteendion kan omzetten in oestron (Naftolin, Ryan, Davies, Reddy, Flores, Petro, Kuhn, White, Takaoka en Wolin, 1975). Voorts bleek dat deze omzetting niet aantoonbaar was in een aantal andere hersengebieden van de rat, zoals in het achterste gedeelte van de hypothalamus, de hypofyse en de cortex (Naftolin, Ryan en Petro, 1972). Kort na de geboorte bleek de omzetting van androgenen in oestrogenen hoger te zijn dan op volwassen leeftijd (Reddy, Naftolin en Ryan, 1974; Weisz en Gibbs, 1974).

5.5. Oestrogeen- en androgeenreceptoren in hersenweefsel

Men neemt aan dat de binding van steroïden aan cytoplasmatische receptoren een noodzakelijke stap is in het mechanisme van werking van steroïdhormonen. Op grond van dit concept zijn de laatste jaren onderzoeken verricht naar de aanwezigheid en eigenschappen van cytoplasmatische steroïdreceptoren in hersenweefsel.

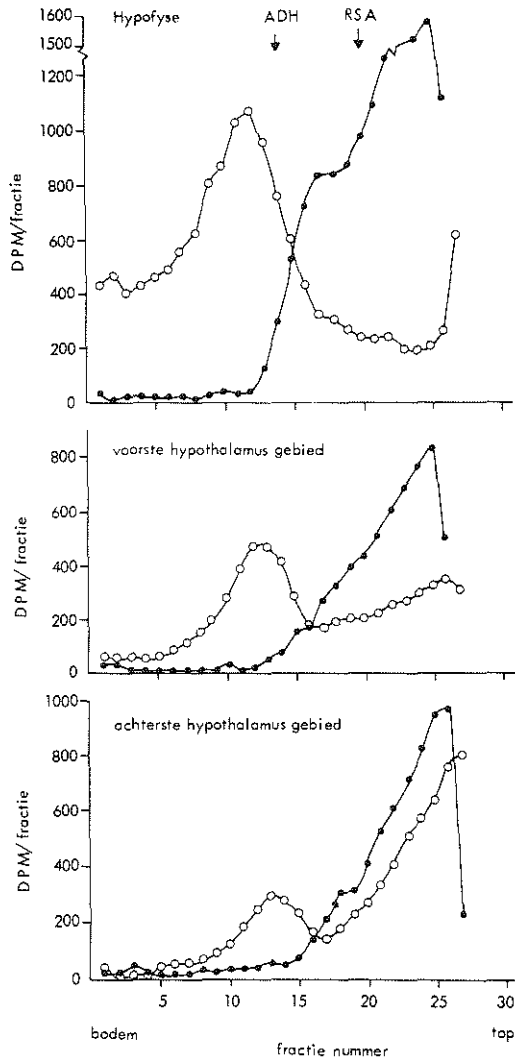
5.5.1. Oestrogeenreceptoren in hersenweefsel

In 1965 werd voor het eerst aangetoond dat na een injectie van radioactief oestradiol dit hormoon opgenomen werd in de hypofyse, de hypothalamus en de grote hersenen van geovariectomeerde vrouwelijke ratten (Ei-

senfeld en Axelrod). Wanneer tegelijkertijd een grote hoeveelheid niet-radioactief oestradiol werd ingespoten, verminderde de hoeveelheid radioactief oestradiol in de hypofyse en hypothalamus, maar niet in de grote hersenen. De interpretatie van deze waarneming was, dat alle weefsels weliswaar oestradiol kunnen binden, maar dat daarnaast in bepaalde weefsels, zoals in dit geval de hypothalamus en de hypofyse, een beperkt aantal verzadigbare bindingsplaatsen voorkomt. Kort daarop bleek uit soortgelijke experimenten dat er bij mannelijke en vrouwelijke ratten vrijwel geen verschil was in de opname van oestradiol door de hypothalamus en hypofyse (Eisenfeld en Axelrod, 1966).

In 1973 kwamen wij (Baum en Vreeburg) tot de overtuiging dat het paringsgedrag bij mannelijke ratten afhankelijk was van uit testosteron gevormd oestradiol. Het was evenwel merkwaardig dat het anti-oestrogeen CI-628 het mannelijk paringsgedrag niet kon remmen (Whalen, Battie en Luttge, 1972), terwijl deze stof wel een sterke onderdrukking van het oestrogeen-afhankelijke receptieve gedrag bij vrouwelijke ratten veroorzaakte. Bovendien was door Clark, Campbell en Peck (1972) gevonden dat na een injectie van oestradiol bij onvolwassen ratten dit steroid wel in een preparaat van celkernen van de hypothalamus van vrouwelijke dieren, maar niet in dat van mannelijke dieren kon worden aangetoond. (Deze vondst zou, zoals later bleek, niet reproduceerbaar zijn). Op grond van deze gegevens hebben wij onderzocht of er in de hersenen van mannelijke ratten een oestrogeenreceptor aanwezig is met dezelfde eigenschappen als die in andere oestrogeen-stimuleerbare weefsels.

Eén van de karakteristieken van de tot dan toe aangetoonde oestradiolreceptoren was hun grote sedimentatiesnelheid in sucrosegradiënten. Dit kenmerk werd op de volgende wijze onderzocht. Volwassen mannelijke ratten werden gecastreerd. Tenminste een maand later werden



Figuur 5.1. De verdeling van de radioactiviteit, na centrifugering door een sucrosegradiënt, van het cytosol van de hypofyse, en van het voorste en het achterste hypothalamusgebied.

0-0 = na incubatie met ^3H -oestradiol.

●-● = na incubatie met ^3H -oestradiol en een 1000-voudige overmaat oestradiol.

ADH = alcoholdehydrogenase, sedimenteert bij 7,4S.

RSH = runder serum-albumine, sedimenteert bij 3,6S.

zij gedood en werden zowel de hypofyse als het voorste gedeelte en het achterste gedeelte van de hypothalamus uitgeprepareerd. Na homogenisatie in TEM-buffer (10 mM TRIS, 1,5 mM EDTA, 1,4 mM mercapto-ethanol, PH 7,4) werd het homogenaat 1 uur bij 100.000 g gecentrifugeerd. Na een incubatie van 2 uur met 0,12 nM ^3H -oestradiol (0,24 nM bij hypofyse) of met ^3H -oestradiol en 1000 maal zoveel niet-radioactief oestradiol, werd het cytosol op een sucrosegradiënt (5-20%, w/v) gebracht en 16 uur bij 150.000 g gecentrifugeerd. Tegelijkertijd werden 2 eiwitten met een bekende sedimentatieconstante, het alcoholdehydrogenase (7,4S) en runder serum albumine (3,6S) gecentrifugeerd. Tenslotte werden de gradiënten in fracties verdeeld en werd de radioactiviteit in de verschillende fracties geteld. Het resultaat (figuur 5.1) was dat in gradiënten van alle drie de onderzochte weefsels pieken van radioactiviteit bij een sedimentatiesnelheid van ongeveer 8S aantoonbaar waren. Deze pieken waren niet aanwezig na incubatie met een overmaat niet-radioactief oestradiol. Uit dit laatste blijkt dat de oestradiolbindende macromoleculen een beperkte bindingscapaciteit hebben.

Vervolgens werd het aantal specifieke bindingsplaatsen voor oestradiol in het voorste en het achterste gedeelte van de hypothalamus, de amygdala, de tussenhersenen, een stukje cortex en de hypofyse van intacte en gecastreerde ratten bepaald. Per experiment werden weefsels van 4 ratten samengevoegd. Na bereiding van het cytosol (procedure identiek aan die welke gebruikt werd bij de sucrosegradiënten) werd 0,2 ml cytosol gedurende 16 uur met 1,2 nM ^3H -oestradiol geïncubeerd. Vervolgens werd het aan eiwit gebonden oestradiol van het ongebonden oestradiol gescheiden met kolomchromatografie (8 cm sephadex G-25, OC). Het aan eiwit gebonden oestradiol (totale binding) is zowel aan de receptor (specifieke binding) als aan andere in het cytosol aanwezige eiwit-

ten gebonden (aspecifieke binding). De laatstgenoemde eiwitten hebben een kleine bindingsaffiniteit en een grote bindingscapaciteit voor oestradiol. Hierdoor verandert de hoeveelheid ^3H -oestradiol die door deze eiwitten gebonden wordt niet wanneer een grote overmaat niet-radioactief oestradiol wordt toegevoegd. Aan de receptor, die maar een kleine bindingscapaciteit heeft, bevindt zich in dit laatste geval vrijwel uitsluitend niet-radioactief oestradiol. In onze experimenten werd daarom met elk cytosol een tweede incubatie uitgevoerd met 1,2 nM ^3H -oestradiol en een 300 maal grotere hoeveelheid niet-radioactief oestradiol, om de aspecifieke binding te bepalen. De specifieke binding werd berekend door de aspecifieke binding af te trekken van de totale binding. In tabel 5.1 is de bindingscapaciteit per mg cytosol-eiwit die door ons en anderen in verschillende hersengebieden gevonden werden, weergegeven. De gegevens in tabel 5.1 laten zien dat de specifieke bindingscapaciteit in de hypofyse vele malen hoger is dan in de hersenen. Van de onderzochte hersengebieden werd de hoogste binding aangetroffen in het voorste gedeelte van de hypothalamus. De bindingscapaciteit in het voorste gedeelte van de hypothalamus was bij gecastreerde dieren significant hoger dan bij intacte dieren. Dezelfde waarneming is ook gedaan door Ginsburg, Greenstein, MacLusky, Morris en Thomas (1975). Deze onderzoekers vonden bovendien een verschil in de bindingscapaciteit van de amygdala van intacte en gecastreerde mannelijke ratten. De geringere bindingscapaciteit van de hypothalamus en de amygdala bij intacte dieren wordt vermoedelijk veroorzaakt door bezetting van de cytoplasmatische receptor met ter plaatse uit testosteron gevormd oestradiol (Ogren, Vértés en Woolly, 1976). De aldus bezette receptor wordt niet gemeten en gaat bovendien van het cytosol naar de kern. De aanwezigheid van testosteron zelf of van zijn 5α -gereduceerde metabolieten heeft *in*

Tabel 5.1. De specifieke bindingscapaciteit voor oestradiol (f mol per mg cytosol-eiwit) in de hypofyse en in verschillende hersengebieden van de rat (gemiddelden \pm standaardfouten van het gemiddelde).

	mannen					vrouwen
	intact ¹	gecastreerd ¹	intact ²	intact ³	gecastreerd ³	geovariectomeerd ⁴
hypofyse	146 \pm 32	144 \pm 19	75,6	160 \pm 30	140 \pm 30	108 ^{**}
hypothalamus			1,5	15 \pm 4	19 \pm 3	3,3
voorste deel	8,3 [*] \pm 1,1	12,2 \pm 1,3				
achterste deel	6,1 \pm 0,8	6,8 \pm 1,9				
amygdala	4,7 \pm 0,6	4,6 \pm 1,7				1,4
tussenhersenen	2,9 \pm 0,4	3,1 \pm 0,9				
cortex	1,6 \pm 0,1	1,6 \pm 1,1				0,3

* p=0,05, in Mann-Whitney U-test, ten opzichte van de gecastreerde ratten.

** f mol per 10 mg weefsel.

Gegevens van ¹Vreeburg, Schretlen en Baum, 1975; ²Van Beurden-Lamers, Brinkmann, Mulder en Van der Molen, 1974; ³Korach en Muldoon, 1974; ⁴Ginsburg, Greenstein, MacLusky, Morris en Thomas, 1974.

vitro weinig invloed op de binding van oestradiol aan zijn receptor. Incubaties van cytosol met ^3H -oestradiol en een grote overmaat testosteron, dihydrotestosteron of 3α -androstaandiol gaven vrijwel dezelfde binding te zien als die waarin alleen met ^3H -oestradiol werd geïncubeerd (tabel 5.2). Wel verdrongen de oestrogenen oestron en

Tabel 5.2. Het effect van een 300-voudige overmaat van enkele oestrogenen, anti-oestrogenen en androgenen op de totale binding van ^3H -oestradiol in het cytosol van hypofyse en hypothalamusweefsel (gemiddelden van 3 experimenten).

	totale binding van ^3H -oestradiol (f mol/mg eiwit)	
	voorstedeel hypothalamus	hypofyse
-	17,4	139,1
oestradiol	6,1	4,6
oestriol	7,7	9,2
oestron	8,1	9,2
MER-25	10,7	69,8
cis-clomipheen	12,3	47,5
3β -androstaandiol	12,7	79,6
trans-clomipheen	17,3	107,3
testosteron	17,7	124,2
5α -dihydrotestosteron	18,0	134,5
3α -androstaandiol	19,4	142,4

Gegevens van Vreeburg, Schretlen en Baum, 1975.

oestriol en de anti-oestrogenen MER-25 en cis-clomipheen oestradiol van de receptor. Cytosol van hypothalamusweefsel bleek met een zeer hoge affiniteit oestradiol te binden. De door ons gevonden associatieconstante $2,7 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ is van dezelfde orde van grootte als die door anderen gevonden werd: $3,8 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ (Korach en Muldoon,

1974); $1 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ (Davies, Naftolin, Ryan, Fishman en Siu, 1975); $1,4 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ (Mercier, Le Guellec, Thieulant, Samperez en Jouan, 1976).

De oestradiolreceptor is bij de rat al aanwezig in de zich ontwikkelende hersenen vlak na de geboorte. De bindingscapaciteit in de hypothalamus en de amygdala is dan ongeveer de helft van die op volwassen leeftijd (Barley, Ginsburg, Greenstein, MacLusky en Thomas, 1974).

5.5.2. *Androgeenreceptoren in hersenweefsel*

In 1971 werden door Jouan, Samperez, Thieulant en Mercier na inspuiting van radioactief testosteron bij gecastreerde ratten androgeenbindende macromoleculen uit hersenweefsel geïsoleerd. In het cytosol van de hypothalamus van prepuberale en gecastreerde volwassen ratten bleek een androgeenbindend eiwit aanwezig met een sedimentatie-coëfficiënt van 8S, en een zeer hoge affiniteit en specificiteit voor testosteron en dihydrotestosteron (Kato en Onouchi, 1973; Barley, Ginsburg, Greenstein, MacLusky en Thomas, 1975; Naess, Attramadal en Aakvaag, 1975; Mercier et al., 1976). De bindingscapaciteit van de androgeenreceptor in de hypothalamus van gecastreerde volwassen ratten ligt rond de 4 f mol/mg cytosol-eiwit; deze waarde is ongeveer 2 maal zo groot als in de cortex (Naess, 1976).

5.6. *De aanwezigheid van testosteron en zijn metaboliëten in de celkernen van hersenweefsel*

In vele weefsels is aangetoond dat na binding van oestradiol, testosteron of dihydrotestosteron aan de receptor, deze combinatie vanuit het cytoplasma naar de kern gaat. Dit bleek ook het geval in hersenweefsel van mannelijke ratten. Na incubatie van plakjes hypothalamusweefsel met oestradiol of dihydrotestosteron, of na

inspuiting van deze steroiden bij gecastreerde ratten, werden zij in de kern aangetroffen (Anderson, Peck en Clark, 1973; Ogren et al., 1976; Lieberburg en McEwen, 1977; Lieberburg, MacLusky en McEwen, 1977). Extractie van kernpreparaten van de hersenen van ratten of muizen met een KCl-oplossing wees uit, dat deze steroiden in de kern aan receptoren gebonden waren (Kato, 1975; Fox, 1977; Lieberburg et al., 1977). Onlangs hebben Lieberburg en McEwen (1975a, b) aangetoond dat na inspuiting van radioactief testosteron bij gecastreerde ratten, oestradiol in de celkernen van het limbische systeem (hypothalamus, preoptische gebied en amygdala) aanwezig is. In een uitvoeriger studie, waarin zij de aard van de radioactiviteit in de hypofyse en een 9-tal hersengebieden na toediening van testosteron onderzochten, bleek dat oestradiol in de celkernen van de amygdala, hypothalamus en het septum in grotere hoeveelheden voorkwam (+ 2 maal) dan testosteron of dihydrotestosteron (Lieberburg en McEwen, 1977). In de hypofyse en de cortex, waar door Naftolin et al. (1972) geen omzetting van androgenen naar oestrogenen kon worden aangetoond, vonden zij ook vrijwel geen oestradiol in de celkernen. Uit deze waarneming en uit het feit dat na perifere toediening van oestradiol dit steroid wel in grote hoeveelheden in de celkernen van de hypofyse en de cortex aanwezig was (Lieberburg en McEwen, 1977), volgt dat de kleine hoeveelheid oestradiol die perifeer uit testosteron gevormd wordt van weinig betekenis is. Om deze reden moet aangenomen worden dat bij de rat het ter plaatse uit testosteron gevormde oestradiol de oestrogeen-afhankelijke processen beïnvloedt.

5.7. *Samenvatting*

Uit onderzoekingen die de laatste jaren zijn ver-

richt, is vast komen te staan, dat in de hersenen van mannelijke ratten testosteron omgezet kan worden in 5α -gereduceerde metabolieten en oestrogenen. In alle hersengebieden die men onderzocht bleken zowel de omzetting van testosteron in dihydrotestosteron als de binding van deze twee androgenen aan receptoren voor te komen. Door ons werd aangetoond dat in het cytoplasma van de verschillende hersengebieden die wij onderzochten, specifieke oestradiolbindende macromoleculen voorkomen. Bij nader onderzoek, dat beperkt bleef tot de hypofyse en de hypothalamus, bleken deze macromoleculen de kenmerkende eigenschappen van oestradiolreceptoren te hebben. Omdat bij mannelijke ratten in de hypothalamus en de amygdala testosteron omgezet kan worden in oestradiol, en bij deze dieren de concentratie van oestradiol in het perifere bloed bijzonder laag is (De Jong, Hey en Van der Molen, 1973), zijn waarschijnlijk alleen de oestradiolreceptoren in de hypothalamus en amygdala van betekenis. De bindingscapaciteit voor oestradiol in het voorste hypothalamusgebied was bij gecastreerde ratten groter dan bij intacte ratten. Dit verschijnsel wordt wellicht veroorzaakt doordat bij intacte ratten in het voorste gedeelte van de hypothalamus testosteron in oestradiol wordt omgezet. In competitie-experimenten bleken de anti-oestrogenen MER-25 en cis-clomipheen oestradiol van de receptor te verdringen. Deze waarneming en de vondst dat anti-oestrogenen geen suppressie geven van het mannelijk paringsgedrag (dat afhankelijk is van oestradiol, zie hoofdstuk 6), brachten ons ertoe het effect van MER-25 op dit gedrag te bestuderen. Uit dit onderzoek bleek dat MER-25, toegediend aan gecastreerde ratten, het mannelijk paringsgedrag niet remt, maar juist stimuleert (Baum en Vreeburg, 1976).

HOOFDSTUK 6

EFFECTEN VAN TESTOSTERON OP HET PARINGSGEDRAG EN DE GONADOTROFINENSECRETIE BIJ DE MANNELIJKE RAT

6.1. Inleiding

De testikels kunnen door middel van de androgenen die zij afscheiden het gedrag en de gonadotrofinensecretie beïnvloeden. Toen duidelijk werd dat androgenen, met name testosteron, in het centrale zenuwstelsel konden worden omgezet in andere steroïden, besloten wij onderzoek te verrichten naar de fysiologische betekenis van dit metabolisme. Tijdens dit onderzoek hebben wij ons voornamelijk bezig gehouden met effecten van testosteron en zijn metabolieten op het paringsgedrag en de gonadotrofinensecretie bij mannelijke ratten.

6.2. Effecten van testosteron op het paringsgedrag

Bij de meeste diersoorten houden de mannetjes na castratie op met copuleren; behandeling met testosteron leidt bij deze dieren tot terugkeer van de paringsactiviteiten (Young, 1961). In 1970 ontdekten McDonald, Beyer, Newton, Brien, Baker, Tan, Sampson, Kitching, Greenhill en Pritchard dat na behandeling met dihydrotestosteronpropionaat (125 µg per dag gedurende maximaal 17 dagen), het paringsgedrag bij gecastreerde mannelijke ratten niet terugkeerde. Dit was intrigerend omdat bij dezelfde ratten onder invloed van dit androgeen de prostaat en de zaadblazen sterk gegroeid waren.

Wij besloten dit experiment te herhalen met als belangrijkste verschillen een hogere dosering van het dihydrotestosteronpropionaat (300 µg per dag) en een langere voortzetting van het experiment (2 maanden). Desondanks vertoonden de mannetjes maar zeer zelden paringsgedrag. Dat dit experiment toch nog tot resultaten zou leiden was de 'danken' aan het gedrag van de vrouwelijke 'stimulus'-dieren. Deze geovariectomeerde dieren, die voor iedere test met 100 µg oestradiolbenzoaat (48 uur voor de test) en met 1 mg progesteron (4 uur voor de test) werden ingespoten, vertoonden opvallend vaak gedragingen die normaal alleen bij mannelijke dieren gezien worden. Deze waarneming, en het ontbreken van enig effect van de dihydrotestosteron-behandeling, brachten ons op de gedachte dat bij mannelijke ratten het paringsgedrag afhankelijk zou kunnen zijn van oestrogenen.

Vierendertig mannelijke ratten werden op een leeftijd van 49-55 dagen gecastreerd. Vanaf de 31ste dag na castratie kregen de dieren dagelijks een subcutane injectie met steroïden die opgelost waren in olie. Groep 1 (n=8) kreeg 200 µg testosteronpropionaat, groep 2 (n=10) 2 µg oestradiolbenzoaat en 200 µg dihydrotestosteronpropionaat, groep 3 (n=8) kreeg 4 µg testosteronpropionaat en 200 µg dihydrotestosteronpropionaat, terwijl een vierde groep (n=8) alleen 2 µg oestradiolbenzoaat kreeg. In dit experiment werd het gedrag van ratten die alleen dihydrotestosteronpropionaat toegediend kregen, niet bestudeerd omdat naar onze mening de onwerkzaamheid van deze behandeling voldoende was aangetoond. Zestien dagen na het begin van de hormoon-injecties werd begonnen met het testen van het paringsgedrag. Voor dit doel werd één mannelijke rat in een halfcirkelvormige kooi samengebracht met twee bronstige vrouwelijke ratten. De gedragingen die geregistreerd werden, waren de beklimming, de beklimming met stoten, de intromissie en de ejaculatie. Nadat de mannelijke rat de flanken van het

vrouwtje met zijn voorpoten omvat heeft -dit gedrag heet beklimming- voert hij een aantal snelle stootbewegingen uit met zijn achterlijf. Wanneer hierbij zijn penis in de vagina van het vrouwtje komt, wordt dit gedrag intromissie genoemd; is dit niet het geval, dan wordt van beklimming met stoten gesproken. Het contact tussen het mannetje en het vrouwtje is van korte duur. Iedere beklimming of intromissie duurt maar enkele seconden. Wanneer de rat een aantal intromissies heeft uitgevoerd, treedt een ejaculatie op. Hierna komt een rustpauze voor, waarna de paring opnieuw begint. De vrouwelijke rat maakt de paring mogelijk door tijdens de beklimming met een holle rug stil te blijven zitten. Dit gedrag wordt aangeduid met de term lordosegedrag. De gedrags-testen duurden 15 minuten, tenzij een beklimming met stoten was waargenomen. In dit geval werd 30 minuten getest. Wanneer in deze tijd een intromissie had plaatsgevonden, werd de test beëindigd na de ejaculatie of wanneer deze niet optrad, na 60 minuten.

Het experiment werd beëindigd nadat de ratten in 3 weken 6 maal getest waren. In tabel 6.1 zijn enkele resultaten van dit werk samengevat. Alle ratten die met testosteronpropionaat (groep 1) of met oestradiolbenzoaat + dihydrotestosteronpropionaat (groep 2) behandeld waren, kwamen tot ejaculatie. In de testosteronpropionaat + dihydrotestosteronpropionaat-groep (groep 3) en de oestradiolbenzoaat-groep (groep 4) waren dat maar 3 van de 8 dieren. In de 6 testen die uitgevoerd werden, kwamen de dieren uit de groepen 1 en 2 meer dan 4 maal tot ejaculatie. De dieren uit de groepen 3 en 4 die ejaculeerden, deden dat gemiddeld maar 1 maal. De ratten die alleen met oestradiol behandeld waren, vertoonden alle in iedere test een groot aantal beklimmingen met stoten, en intromissies. Zij kwamen evenwel maar zelden, en dan ook nog na een groot aantal intromissies, tot ejaculatiegedrag. Dit verschijnsel werd waar-

Tabel 6.1. Het paringsgedrag in gecastreerde mannelijke ratten na verschillende hormoonbehandelingen.

behandeling	aantal ratten per groep	aantal ratten per groep die minstens éénmaal ejaculeerden	aantal testen waarin de dieren ejaculeerden (mediaan*)	aantal intro- missies tot ejaculatie (mediaan)
testosteronpropionaat (200 µg)	8	8/8	4.0	14.5
oestradiolbenzoaat (2 µg) + dihydrotestosteronpropionaat (200 µg)	10	10/10	4.5	14.8
testosteronpropionaat (4 µg) + dihydrotestosteronpropionaat (200 µg)	8	3/8	1.0**	13.0
oestradiolbenzoaat (2 µg)	8	3/8	1.0**	30.0

* Berekend met de dieren die minstens éénmaal ejaculeerden.

** $p < 0,05$ ten opzichte van testosteronpropionaat-groep, Mann-Whitney U-test.

Gegevens van Baum en Vreeburg, 1973.

schijnlijk veroorzaakt door de conditie van hun penis. Dit orgaan, dat afhankelijk is van androgenen (Bloch en Davidson, 1971), was na behandeling met alleen oestradiol klein, terwijl bovendien de hoornachtige uitsteeksels op de glans ontbraken. Deze uitsteeksels zouden een rol spelen bij de prikkeling van zenuwuiteinden in de penis (Beach en Levinson, 1950; Cooper, 1972). Deze verklaring voor het ontbreken van ejaculaties lijkt redelijk omdat ook in andere onderzoeken onvolledig mannelijk paringsgedrag gezien werd wanneer de penis gedenerveerd was (Lodder en Zeilmaker, 1976), of behandeld met een lokaal werkend anestheticum (Adler en Berman, 1966).

De resultaten die wij en anderen (Larsson, Södersten en Beyer, 1973; Feder, Naftolin en Ryan, 1974) in soortgelijk onderzoek verkregen, maken aannemelijk dat oestradiol het mannelijk paringsgedrag stimuleert door effecten op het centrale zenuwstelsel en dat dihydrotestosteron dit gedrag beïnvloedt via effecten op perifere organen als de penis. Hiermee was evenwel niet uitgesloten dat dihydrotestosteron in aanwezigheid van oestradiol ook het gedrag zou kunnen stimuleren via effecten op het centrale zenuwstelsel.

Met het doel de effecten van dihydrotestosteron die via de uitwendige genitalia van de rat tot stand komen zoveel mogelijk uit te sluiten, besloten wij het mannelijk paringsgedrag in de vrouwelijke rat te onderzoeken. Dit is mogelijk omdat geovariectomeerde vrouwelijke ratten na behandeling met testosteron, bepaalde componenten van het mannelijk paringsgedrag, zoals de beklimming met stoten, vertonen (Pfaff, 1970). Uiteraard zijn door het ontbreken van de penis intromissies en ejaculaties onmogelijk. Wel worden soms tijdens een behandeling met uitzonderlijk grote hoeveelheden geslachtshormonen de typische intromissie- en ejaculatiegedragingen waargenomen (Emery en Sachs, 1975).

Vierentwintig ratten werden geovariectomeerd. Zes weken later werd begonnen met het dagelijks inspuiten van verschillende hormonen. Groep 1 (n=8) kreeg 200 µg testosteronpropionaat, groep 2 (n=8) 2 µg oestradiolbenzooat, groep 3 (n=8) 2 µg oestradiolbenzooat + 200 µg dihydrotestosteronpropionaat. Op de dagen 17, 20, 25 en 28 na het begin van de hormoonbehandeling werd het mannelijk paringsgedrag gedurende 15 minuten getest. Dit werd gedaan nadat op de uitwendige genitalia een pasta met 5% lidocaïne (lokaal verdovingsmiddel) was aangebracht om een mogelijk aanwezige invloed van deze weefsels uit te schakelen. Daarnaast werden nog 4 gedrags-testen uitgevoerd na insmering met vaseline op de dagen 21, 24, 29 en 32. Uit de gegevens in tabel 6.2. blijkt

Tabel 6.2. Het mannelijk paringsgedrag in geovariëctomeerde vrouwelijke ratten na behandeling met verschillende steroïden. (gemiddelden ± standaardfouten van 8 ratten).

behandeling	beklimming		beklimming met stoten	
	lidocaïne	vaseline	lidocaïne	vaseline
oestradiol- benzooat (2 µg)	2 ± 0	2 ± 0	8 ± 1	8 ± 2
oestradiol- benzooat (2 µg) + dihydrotestosteron- propionaat (200 µg)	8 ± 1*	6 ± 0*	16 ± 2*	19 ± 3*
testosteron- propionaat (200 µg)	5 ± 1*	7 ± 0*	19 ± 2*	17 ± 2*

* $p < 0,01$ ten opzichte van oestradiolbenzooat-groep.

Gegevens van Baum, Södersten en Vreeburg, 1974.

dat de vrouwelijke dieren die met testosteronpropionaat of dihydrotestosteronpropionaat + oestradiolbenzooat waren behandeld meer (+ 2 maal) beklimmingen en beklimmingen met stoten lieten zien dan de dieren die alleen met oestradiolbenzooat behandeld waren. Deze resultaten te zamen met het ontbreken van enig effect van de lidocaïnebehandeling vormen een belangrijke aanwijzing dat dihydrotestosteron bij de rat het mannelijk paringsgedrag ook stimuleert via het centrale zenuwstelsel. Onlangs hebben Lodder en Baum (1977) deze veronderstelling bevestigd. Mannelijke ratten waarbij de nervus pudendus was doorgesneden (deze zenuw loopt naar de penis en de aangrenzende huid) vertoonden na castratie en oestradiolbenzooatbehandeling in een test van 10 minuten gemiddeld 6 beklimmingen met stoten. Bij dieren die naast oestradiolbenzooat ook nog dihydrotestosteronpropionaat kregen toegediend, werden per test 19 beklimmingen met stoten waargenomen.

De hier beschreven experimenten en de gegevens betreffende de omzetting en binding van testosteron en zijn metabolieten in hersenweefsel (hoofdstuk 5) maken aannemelijk dat bij intacte mannelijke ratten het paringsgedrag afhankelijk is van in de hersenen gevormd oestradiol. In welke mate de extra stimulatie van het mannelijk gedrag dat na toediening van dihydrotestosteron gezien werd, ook bij intacte dieren door dit androgeen veroorzaakt wordt, is onduidelijk omdat na toediening van radioactief testosteron ongeveer gelijke hoeveelheden van testosteron en dihydrotestosteron in de celkernen van hersenweefsel aanwezig waren (Lieberburg en McEwen, 1977).

Ook bij sommige andere diersoorten heeft oestradiol effecten op het mannelijk paringsgedrag; bij het varken (Joshi en Raeside, 1973) en het hert (Fletcher en Short, 1974) wordt het mannelijk paringsgedrag door dit steroid sterk gestimuleerd. Daarentegen heeft bij de cavia oestradiol totaal geen effect, en wordt normaal parings-

gedrag gezien na behandeling met dihydrotestosteron (Alsum en Goy, 1974). Ook bij bepaalde muizenstammen (Luttge en Hall, 1973) en de hamster (Whalen en DeBold, 1974) is dihydrotestosteron werkzaam. Wel moest bij hamsters dihydrotestosteron in een dosering van meer dan 500 μg per dag worden toegediend om het paringsgedrag in stand te houden; een zeer hoge dosering als we bedenken dat van testosteron maar 50 μg per dag nodig was om dit te bereiken. Wellicht zou de dosering van dihydrotestosteron verlaagd kunnen worden als tevens een kleine hoeveelheid oestradiol zou worden toegediend. Immers, bij het konijn werd door 5 μg oestradiolbenzoaat het effect van 2,5 mg dihydrotestosteron op het paringsgedrag enorm versterkt (Beyer, Torre, Larsson en Pérez-Palacios, 1975).

6.3. Effecten van testosteron op de gonadotrofinsecretie

Na castratie neemt de gonadotrofinconcentratie in het bloed van mannelijke ratten sterk toe. Drie weken na deze ingreep zijn de waarden van LH \pm 7 maal en van FSH \pm 3 maal zo hoog als de uitgangswaarden (tabel 6.3). Door toediening van bepaalde steroïden kan deze stijging worden tegengegaan. De hoeveelheden die na castratie dagelijks moeten worden toegediend om de gonadotrofinen op het normale niveau te handhaven, lopen voor de verschillende steroïden sterk uiteen. De gonadotrofinen onderdrukkende werking van testosteron is betrekkelijk zwak in vergelijking met die van dihydrotestosteron of oestradiol (Swerdloff, Walsh en Odell, 1972; Swerdloff en Walsh, 1973). Verjans, Eik-Nes, Aafjes, Vels en Van der Molen (1974) vonden dat aan volwassen gecastreerde ratten ongeveer 25 μg testosteronpropionaat, 5 μg dihydrotestosteronpropionaat of 0,3 μg oestradiolbenzoaat per 100 g lichaamsgewicht per dag toegediend moet worden

om LH op het niveau van voor de castratie te houden. De zojuist genoemde hoeveelheid testosteronpropionaat -75 µg aan een rat van 300 gram- is ongeveer gelijk aan de hoeveelheid testosteron die bij de volwassen rat door de testikels aan het bloed wordt afgegeven (De Jong, Hey en Van der Molen, 1973).

Tabel 6.3. Effecten van androsta-1,4,6-trien-3,17-dion (ATD) op de plasma-concentratie van gonadotrofinen en de gewichten van prostaat en zaadblazen bij gecastreerde ratten (gemiddelden ± standaardfouten van 5 dieren).

	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	prostaat (mg)	zaadblazen (mg)
intacte ratten	84 ± 8	395 ± 32	291 ± 22	273 ± 6
castraten behandeld met:				
testosteron	354 ± 125	1031 ± 127	249 ± 34	238 ± 22
testosteron + ATD	23 ± 10*	425 ± 105*	218 ± 28	255 ± 20
ATD	626 ± 144	1207 ± 44	55 ± 13	91 ± 9
leeg buisje	577 ± 65	1187 ± 47	53 ± 10	108 ± 5

*p<0,001 ten opzichte van testosteron-groep, Student's t-test.

De sterke onderdrukking van de gonadotrofinensecretie die met oestradiol en dihydrotestosteron verkregen kan worden, en hun vorming en binding in hersenweefsel, maken onduidelijk of en zo ja in welke mate beide betrokken zijn bij de regulatie van de gonadotrofinensecretie. Dit vraagstuk werd onderzocht door aan mannelijke ratten het steroid androsta-1,4,6-trien-3,17-dion (ATD) toe te dienen. Van deze stof is bekend dat het de

omzetting van testosteron naar oestradiol in een microsomenpreparaat van de menselijke placenta (Schwarzel, Kruggel en Brodie, 1973) en in ratte-hersenen (Lieberburg, Wallach en McEwen, 1977) remt.

Twintig volwassen mannelijke ratten werde gecastreerd. Onmiddellijk na castratie kreeg groep 1 (n=5) siliconen rubber buisjes met testosteron onder de huid geïmplantéerd, groep 2 (n=5) kreeg buisjes met testosteron en buisjes met ATD, groep 3 (n=5) kreeg buisjes met ATD en groep 4 (n=5) kreeg lege buisjes. Er werd gebruik gemaakt van siliconen rubber buisjes gevuld met steroiden, omdat deze gedurende lage tijd een constante hoeveelheid van het steroid aan het proefdier 'afgeven' (Chang en Kincl, 1970). De 6 cm lange met ATD gevulde buisjes lieten in een fysiologische zout-oplossing gebracht, per 24 uur tussen de 600 en 700 µg door. De concentratie van het ATD in plasma kon bepaald worden, doordat dit steroid op een gaschromatograaf met een electron capture detector goed meetbaar was (2 ng ATD geeft een uitslag die in dezelfde orde van grootte ligt als 1 ng testosteronheptafluorobutyráat). Bloed werd verzameld direct voor castratie (dag 1) en op dagen 7, 14 en 21. In tabel 6.3 zijn de FSH en LH concentraties en de gewichten van de prostaat en zaadblazen op dag 21 weergegeven. De gegevens laten zien dat ATD bij gecastreerde ratten het gewicht van de prostaat en de zaadblazen niet beïnvloedt. Het meest belangwekkend was dat ATD, een steroid dat alleen toegediend geen onderdrukking van de gonadotrofinensecretie geeft, de gonadotrofinen-remmende werking van testosteron geweldig versterkte. Wanneer we aannemen dat de werking van ATD berust op een remming van de omzetting van testosteron naar oestradiol, dan komt de versterking van de gonadotrofinen-onderdrukkende werking van testosteron door ATD tot stand doordat in aanwezigheid van ATD minder oestradiol gevormd wordt. Dit betekent dat het uit testoste-

ron gevormde oestradiol de gonadotrofinensecretie stimuleert. In overeenstemming hiermee is de waarneming dat een kleine hoeveelheid oestradiol toegediend aan intacte mannelijke ratten de FSH-concentratie in serum verhoogt (De Jong, Uilenbroek en Van der Molen, 1975). Hoewel het experiment met ATD nog onvolledig is en niet meer dan een aanwijzing geeft dat het uit testosteron gevormde oestradiol de gonadotrofinensecretie stimuleert, is op grond van de verkregen resultaten een gonadotrofinenonderdrukking door het uit testosteron gevormde oestradiol uiterst onwaarschijnlijk.

Bij de mens lijkt daarentegen het uit testosteron gevormde oestradiol wel een onderdrukking van de gonadotrofinen te geven. Een infusie van oestradiol in de hoeveelheid die per dag door perifere omzettingen en testikulaire secretie in het bloed terechtkomt, ging gepaard met een significante daling van de LH- en testosteronconcentraties in het plasma (Stewart-Bentley, Odell en Horton, 1974).

6.4. Effecten van testosteron op de vroege ontwikkeling van de hersenen

Tijdens een vroege fase van ontwikkeling zijn mannelijke en vrouwelijke individuen in vorm aan elkaar gelijk. In dit stadium zijn de gonaden, de sinus urogenitalis en het tuberculum genitale nog niet gedifferentieerd en zijn een tweetal paren van gangen, die van Wolff en van Müller, aanwezig. Nadat zich uit de gonaden testikels of ovaria gevormd hebben, voltrekt zich de geslachtsdifferentiatie van de in- en uitwendige genitalia. Bij zoogdieren ontstaan onder invloed van androgenen uit de buizen van Wolff de epididymis, het vas deferens en de zaadblazen, uit de sinus urogenitalis de prostaat en uit het tuberculum genitale de penis.

Voorts worden de gangen van Müller (de oervorm van de uterus) door een ander testikelsecreet tot regressie gebracht. Is er een ovarium aanwezig, of is de testikel verwijderd, dan ontwikkelen zich de gangen van Müller en verschrompelen de gangen van Wolff. Bovendien komen dan uit de sinus urogenitalis en het tuberculum genitale vrouwelijke inwendige en uitwendige genitalia als de vagina en de clitoris tot ontwikkeling. Kort samengevat: in aanwezigheid van androgenen ontwikkelen zoogdieren zich in mannelijke richting, bij afwezigheid in vrouwelijke richting.

De manier waarop de ontwikkeling van het nog niet gedifferentieerde individu tot zijn mannelijke of vrouwelijke verschijningsvorm verloopt, vertoont bepaalde overeenkomsten met de wijze waarop de verschillen in de gonadotrofinensecretie en het paringsgedrag tussen mannelijke en vrouwelijke dieren ontstaan. Voortbouwend op de eerder genoemde experimenten van Pfeiffer (1936) kwam Harris (1955) tot de conclusie dat bij de mannelijke rat de aanwezigheid van androgenen tijdens een vroege ontwikkelingsfase van de hersenen leidde tot het onvermogen om op volwassen leeftijd ovulaties in een ovarium teweeg te brengen. Bij afwezigheid van androgenen, hetgeen het geval is bij de zich ontwikkelende vrouwelijke rat, zou als vanzelf het vermogen om cyclisch gonadotrofinen uit te scheiden ontstaan.

Bijna 10 jaar later -Young zegt hierover: "Explanation may lie in the stigma any activity associated with sexual behaviour has long borne" - waren Young et al. (1964) de eersten die de 'organiserende werking' van testosteron op die zenuwweefsels die betrokken zijn bij het paringsgedrag beschreven; androgenen zouden de mogelijkheid om op volwassen leeftijd vrouwelijk paringsgedrag te vertonen, onderdrukken en tegelijk het vermogen tot mannelijk paringsgedrag stimuleren. Dit laatste is onzeker omdat volwassen vrouwelijke ratten onder invloed

van testosteron, voor zover dat mogelijk is, mannelijk paringsgedrag kunnen vertonen.

Tijdens de geslachtsdifferentiatie van de hersenen van mannelijke ratten, die bij deze dieren gedeeltelijk na de geboorte plaatsvindt, bevat het plasma testosteron (Resko, Feder en Goy, 1968), en zijn in de hersenen enzymen aanwezig die testosteron naar oestradiol en dihydrotestosteron kunnen omzetten. Een aanwijzing dat de vermannelijking van de hersenen door oestrogenen zou kunnen worden veroorzaakt is het feit dat toediening van oestradiol aan pasgeboren vrouwelijke ratten het vermogen tot cyclische ovarium-activiteit en lordosegedrag op volwassen leeftijd onderdrukt (Gorski, 1963; Whalen en Nadler, 1963). Dit effect kan niet bereikt worden door toediening van dihydrotestosteron (McDonald en Doughty, 1972a). Bovendien vonden deze laatstgenoemde onderzoekers (1972b) dat het anti-oestrogene preparaat MER-25 de vermannelijkende werking van testosteron bij pasgeboren vrouwelijke ratten remde. Brown-Grant (1974), die een vrijwel identiek experiment uitvoerde, kon evenwel deze waarneming niet bevestigen. Om deze reden besloten wij op een andere wijze, namelijk door toediening van ATD aan pasgeboren mannelijke ratten, de betekenis van de oestradiolvorming te onderzoeken.

Mannelijke ratten werden op de dagen 1 (dag van de geboorte), 3, 5, 10 en 15 ingespoten met 1 mg ATD in 0,1 ml olie. Bij controle-ratten werd olie ingespoten. Op dag 55 werd bij 3 intacte ATD-ratten, 5 op volwassen leeftijd gecastreerde ATD-ratten en 6 op volwassen leeftijd gecastreerde controles, het lordosegedrag na inspuiting met oestradiolbenzoaat en progesteron bestudeerd. Alle 8 ATD-dieren waren goed receptief. Vrijwel iedere beklimning door het 'stimulus'-mannetje werd door de ATD-rat beantwoord met een lordose. Deze waarneming is vastgelegd in het lordose-quotiënt (aantal lordoses/aantal beklimmingsen, x 100) dat varieerde tussen de 72

en 100. Daarentegen werd geen receptief gedrag bij de controle-dieren waargenomen. Om na te gaan of de ATD-ratten in staat waren om cyclisch gonadotrofinen uit te scheiden, werden bij 10 ATD-ratten tussen 30 en 60 dagen na de geboorte de testikels verwijderd. Tegelijkertijd werd bij deze dieren een ovarium onder het nierkapsel en een stukje vaginaweefsel in de buikhuid gebracht. Uit de uitstrijkjes die dagelijks van het vaginaweefsel gemaakt werden bleek, dat het ovarium niet cyclisch functioneerde. Dit werd bevestigd in de histologie van de ovaria, die tussen 30 en 45 dagen na implantatie werden uitgeprepareerd. Uit deze resultaten blijkt dat mannelijke ratten die na de geboorte op de boven beschreven wijze met ATD worden ingespoten, op volwassen leeftijd wel vrouwelijk paringsgedrag kunnen vertonen, maar niet in staat zijn om cyclisch gonadotrofinen uit te scheiden. Dit laatste kon naar onze mening het gevolg zijn van een onvoldoende remming van de oestradiolvorming door het ATD. Daarom besloten wij ATD in siliconen rubber buisjes onder de huid van pasgeboren ratten te implanteren, om een voortdurend hoge ATD-concentratie in het plasma teweeg te brengen. Bij 3 dagen oude ratten met ATD-buisjes onder de huid was ongeveer 500 ng ATD per ml plasma aanwezig. Omdat ATD de radioimmunologische bepaling van testosteron stoorde, was het noodzakelijk bij de bepaling van testosteron dunne laag chromatografie toe te passen om testosteron volledig van ATD te scheiden. De hoeveelheid testosteron in het plasma of de testikels van 3 dagen oude mannelijke ratten bleek niet significant te verschillen van de waarden bij niet behandelde ratten (tabel 6.4). Negen met ATD behandelde dieren en 6 controle-dieren kregen op dag 30 een ovarium en een stukje vaginaweefsel geïmplantéerd. Tegelijkertijd werden de siliconen rubber buisjes verwijderd. Op dag 55 werden 7 ATD-dieren (2 dieren werden niet getest) en 6 controle-dieren één nacht bij intacte vrouwelijke

Tabel 6.4. Effecten van vroege implantatie van androsta-1,4,6-trien-3,17-dion (ATD) bij mannelijke ratten.

	testikel- gewicht op dag 55	dieren met ovariële cycli tussen dag 55 en 85	testosteronconcentratie op dag 3		ATD-concentratie op dag 3 in plasma
			plasma (ng/ml)	testikel (ng/g)	(ng/ml)
ATD- ratten	970 ± 80 (n=9)	5* (n=9)	2,1 ± 0,5 (n=6)	386 ± 210 (n=6)	520 ± 70 (n=5)
controle- ratten	1040 ± 20 (n=6)	0 (n=6)	0,9 ± 0,4 (n=8)	530 ± 144 (n=8)	0 (n=3)

*p<0,05, Student's t-test.

Gegevens van Vreeburg, Van der Vaart en Van der Schoot, 1977.

ratten in proestrus gebracht om hun vruchtbaarheid vast te stellen. De volgende dag werden hun testikels verwijderd en gewogen. Het testikelgewicht was bij beide groepen gelijk. Vijf van de zeven ATD-ratten en alle 6 controles bleken vruchtbaar. Na verwijdering van de testikels werd in 5 van de 9 ATD-dieren een regelmatige 5-daagse cyclus in het vaginaweefsel waargenomen. Bij de controle-ratten werden geen cycli gezien. De zojuist beschreven experimenten laten zien dat bij pasgeboren mannelijke ratten de vermannelijking van de hersenen kan worden tegengegaan met ATD. Uit de normale testosteronconcentratie in de testikel en in het plasma tijdens de behandeling met ATD volgt, dat de ATD-werking niet tot stand komt door onderdrukking van de testikel-activiteit, en dat het waargenomen effect waarschijnlijk een gevolg was van de remming van de oestradiolvorming in de hersenen. Lieberburg et al. (1977) hebben vastgesteld dat na toediening van ATD aan pasgeboren ratten veel minder (±

6 maal) oestradiol in de celkernen van de hersenen aanwezig was dan bij de controle-dieren. De hoeveelheid testosteron en dihydrotestosteron in de celkernen was daarentegen hetzelfde in de ATD-behandelde dieren en de controle-dieren. Hieruit volgt dat bij mannelijke ratten na de geboorte het vermogen tot vrouwelijk paringsgedrag en cyclische gonadotrofinensecretie verdwijnt onder invloed van oestrogenen en dat testosteron en zijn 5α -gereduceerde metabolieten in dit proces geen rol van betekenis spelen.

6.5. *Samenvatting*

Bij mannelijke ratten is het paringsgedrag afhankelijk van oestradiol. In aanwezigheid van oestradiol geeft dihydrotestosteron een verdere stimulatie van dit gedrag. Terwijl oestradiol waarschijnlijk alleen in het centrale zenuwstelsel werkt, komen de effecten van dihydrotestosteron zowel via de hersenen als via de penis tot stand.

Na castratie kan door toediening van testosteron de stijging in de gonadotrofinenconcentratie in het plasma worden tegengegaan. Dit effect wordt door testosteron zelf of door dihydrotestosteron veroorzaakt. In de hersenen uit testosteron gevormd oestradiol werkt wellicht de door testosteron of dihydrotestosteron veroorzaakte gonadotrofinenremming tegen.

Bij mannelijke ratten verdwijnt vlak na de geboorte onder invloed van testosteron het vermogen om op volwassen leeftijd ovulaties in een geïmplantéerd ovarium te weeg te brengen. In dezelfde periode gaat bij deze dieren ook de mogelijkheid verloren om later vrouwelijk paringsgedrag te vertonen. Het verlies van deze eigenschappen wordt waarschijnlijk veroorzaakt door oestradiol dat in de hersenen uit testosteron wordt gevormd.

HOOFDSTUK 7

SAMENVATTING

In vele weefsels en organen die door testosteron beïnvloed worden, wordt testosteron omgezet in 5α -gereduceerde metabolieten en oestrogenen. In dit proefschrift is de betekenis van deze omzettingen voor de epididymis en bepaalde hersenfuncties beschreven.

Voor de rijping van de spermatozoën en het behoud van hun fertiliserend vermogen in de epididymis, zijn androgenen noodzakelijk (hoofdstuk 2). De epididymis van de rat wordt zowel door het perifere bloed als door de vloeistof die via de ductuli efferentes het lumen van dit orgaan binnenkomt, van androgenen voorzien (hoofdstuk 3). Hoewel testosteron in het perifere bloed en in de ductuli efferentes-vloeistof kwantitatief het belangrijkste androgeen is, werd in de cellen en de luminale vloeistof van de epididymis een hogere concentratie van dihydrotestosteron dan van testosteron gevonden. Dit is waarschijnlijk een gevolg van het feit dat in de epididymis, een orgaan dat een hoge 5α -reductase-activiteit heeft, androgeenbindende eiwitten met een hoge affiniteit voor dihydrotestosteron voorkomen (hoofdstuk 4). Bij gecastreerde ratten, die dihydrotestosteron toegediend kregen, bleven de in de epididymis aanwezige spermatozoën de maximaal mogelijke tijd (± 28 dagen) vruchtbaar. Intacte dieren die met zoveel dihydrotestosteron behandeld werden dat hun testikulaire testosteronproductie verwaarloosbaar klein geweest moet zijn, bleven 36 dagen vruchtbaar. Hieruit volgt dat hun nakomelingen ontstaan zijn uit spermatozoën die gerijpt zijn nadat met de dihydrotestosteronbehandeling begonnen was. Uit

bovenstaande waarnemingen en het feit dat na toediening van radioactief testosteron dihydrotestosteron kwantitatief het belangrijkste steroid in de celkernen van de epididymis was, volgt dat de epididymisfunctie van de intacte rat door dihydrotestosteron geregeld wordt.

In de hersenen van de rat ontstaan uit testosteron 5α -gereduceerde metaboliëten en oestrogenen (hoofdstuk 5). In de hypofyse en de verschillende hersengebieden die wij onderzochten werd verzadigbare oestradiolbinding aangetroffen. Bij nader onderzoek van de hypofyse en de hypothalamus kon daar de aanwezigheid van cytoplasmatische oestradiolreceptoren vastgesteld worden. De oestradiolreceptoren die in de hersenen van de mannelijke rat voorkomen zijn waarschijnlijk alleen van fysiologisch belang in die gebieden, waar omzetting van testosteron in oestradiol kan plaatsvinden. De omzetting van testosteron in dihydrotestosteron en de binding van deze androgenen bleken in alle hersengebieden die men onderzocht, aanwezig te zijn.

Bij gecastreerde ratten die alleen met dihydrotestosteron werden behandeld, werd geen paringsgedrag waargenomen (hoofdstuk 6). Werd naast dihydrotestosteron oestradiol toegediend, dan keerde dit gedrag terug. Uit dit experiment en de in hoofdstuk 5 vermelde gegevens betreffende de vorming en binding van oestradiol in hersenweefsel volgt dat het mannelijk paringsgedrag van de rat afhankelijk is van oestradiol. In aanwezigheid van dit oestrogene stimuleert dihydrotestosteron dit gedrag door effecten op de hersenen en de penis.

Bij gecastreerde mannelijke ratten werd een zeer sterke toename in de gonadotrofinen-onderdrukkende werking van testosteron gezien, wanneer een remmer (ATD) van de oestradiolvorming werd toegediend. Dit experiment, in combinatie met de waarneming dat toediening van dihydrotestosteron een krachtige remming van de gonadotrofinensecretie geeft, duidt erop dat het in de herse-

nen uit testosteron gevormde oestradiol eerder de gonadotrofinensecretie stimuleert dan remt.

Met het doel de betekenis van de oestradiolvorming in de zich ontwikkelende hersenen te onderzoeken, werd ATD aan pasgeboren mannelijk ratten toegediend. De op deze wijze behandelde dieren bleken op volwassen leeftijd in staat te zijn zich voort te planten. Bovendien vertoonden zij na toediening van oestradiol en progesteron normaal vrouwelijk paringsgedrag. Bij een aantal van deze ratten kwamen ovulaties voor in de onder het nierkapsel geïmplanteerde ovaria. Het feit dat het toegediende ATD waarschijnlijk wel een effect had op de hoeveelheid oestradiol maar niet op de hoeveelheid testosteron of dihydrotestosteron in de zich ontwikkelende hersenen, leidt tot de conclusie dat de bovengenoemde aspecten van de geslachtsdifferentiatie bij mannelijke ratten tot stand komen onder invloed van uit testosteron gevormd oestradiol.

SUMMARY

In many tissues and organs that are influenced by testosterone, this steroid is converted into 5α -reduced metabolites and oestrogens. In this thesis the significance of this metabolism for the function of the epididymis and of the brain is described.

Androgens are required for the maturation of spermatozoa and for the maintenance of their fertilizing potency in the epididymis (chapter 2). The epididymis of the rat receives androgens via both the peripheral circulation and the fluid that enters the lumen of this organ from the ductuli efferentes (chapter 3). Although testosterone is quantitatively the major androgen in peripheral blood and in ductuli efferentes fluid, the cells and the luminal fluid of the epididymis were found to contain higher concentrations of dihydrotestosterone than of testosterone. This probably reflects the fact that the epididymis can convert testosterone to dihydrotestosterone and that it also contains androgen binding proteins with a high affinity for dihydrotestosterone (chapter 4). Castrated rats treated with dihydrotestosterone remained fertile for 28 days, which has been shown to be the maximal duration of fertility following ligation of the corpus epididymidis. Intact animals that were given high doses of dihydrotestosterone, so that testicular production of testosterone was suppressed, remained fertile for 36 days. This implies that their offspring must have come from spermatozoa that had matured after dihydrotestosterone administration had begun. From these observations, and from the fact that dihydrotestosterone is quantitatively the major steroid in epididymal cell nuclei after administration of radioactive testosterone, it is clear that epididymal function

in intact rats is controlled by dihydrotestosterone.

In the rat brain testosterone is converted into 5 α -reduced metabolites as well as oestrogens (chapter 5). The pituitary and various brain regions examined were found to contain oestradiol-binding proteins. Closer examination of the pituitary gland and the hypothalamus revealed the presence of cytoplasmic oestradiol receptors in these structures. The oestradiol receptors that occur in the male rat brain are probably of physiological significance only in those areas where testosterone can be converted into oestradiol. Conversion of testosterone to dihydrotestosterone and binding of these androgens has been shown by others to occur in all brain areas.

Castrated rats treated with dihydrotestosterone only displayed no mating behaviour (chapter 6). When oestradiol was given along with dihydrotestosterone, then mating behaviour recurred. From this experiment and from the data on formation and binding of oestradiol to brain tissue discussed in chapter 5, it seems clear that male mating behaviour in the rat is dependent on oestradiol. In the presence of this oestrogen, dihydrotestosterone further stimulates mating behaviour by acting both in the brain and the penis.

In castrated male rats the ability of testosterone to inhibit gonadotrophin secretion was greatly enhanced by the concurrent administration of 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD), a substance which inhibits the formation of oestradiol from testosterone. The result of this experiment, in conjunction with the observation that dihydrotestosterone strongly inhibits gonadotrophin secretion, indicates that the oestradiol formed in the brain from testosterone may normally stimulate rather than inhibit gonadotrophin secretion.

In order to study the significance of oestradiol formation in developing brain, ATD was administered to

newborn male rats. Such animals were able to copulate and reproduce in adulthood. However, they also displayed normal feminine mating behaviour after appropriate doses of oestradiol and progesteron. In a number of these animals ovulations occurred in ovaries that had been grafted under the kidney capsule. The fact that ATD probably lowered the concentration of oestradiol in the developing brain without affecting the concentration of testosterone and dihydrotestosterone leads to the conclusion that the defeminization of the neural mechanisms which control gonadotrophin secretion and sexual behaviour in male rats depend on the conversion of testosterone to oestradiol.

LITERATUURLIJST

- Aafjes, J.H. en J.T.M. Vreeburg. Distribution of 5 α -dihydrotestosterone in the epididymis of bull and boar, and its concentration in rat epididymides after ligation of efferent testicular ducts, castration and unilateral gonadectomy. J. Endocr. 1972, 53, 85-93.
- Adler, N. en G. Bermant. Sexual behavior of male rats: effects of reduced sensory feedback. J. comp. physiol. Psychol. 1966, 61, 240-243.
- Alsum, P. en R.W. Goy. Actions of esters of testosterone, dihydrotestosterone or estradiol on sexual behavior in castrated male guinea pigs. Horm. Behav. 1974, 5, 711-717.
- Anderson, J.N., E.J. Peck en J.H. Clark. Nuclear receptor estrogen complex: accumulation, retention and localization in the hypothalamus and pituitary. Endocrinology 1973, 93, 711-717.
- Anderson K.M. en S. Liao. Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. Nature 1968, 219, 277-279.
- Aristoteles. Generation of animals. Translated by A.L. Peck. Eds. T.E. Page, E. Capps, W.H.D. Rouse, L.A. Post en E.H. Warmington. London: Heinemann, Loeb Classical Library, 1953.
- Back, D.J. The presence of metabolites of ³H-testosterone in the lumen of the cauda epididymidis of the rat. Steroids 1975, 25, 413-420.
- Back, D.J., J.C. Shenton en T.D. Glover. The composition of epididymal plasma from the cauda epididymidis of the rat. J. Reprod. Fert. 1974, 40, 211-214.
- Baker, H.W.G., D.J. Bailey, P.D. Feil, L.S. Jefferson, R.J. Santen en C.W. Bardin. Nuclear accumulation of androgens in perfused rat accessory sex organs and testes. Endocrinology 1977, 100, 709-721.
- Barfield, R.J. Activation of copulatory behavior by androgen implanted into the preoptic area of the male fowl. Horm. Behav. 1969, 1, 37-52.
- Barley, J., M. Ginsburg, B.D. Greenstein, N.J. MacLusky en P.J. Thomas. A receptor mediating sexual differentiation? Nature 1974, 252, 259-260.
- Barley, J., M. Ginsburg, B.D. Greenstein, N.J. MacLusky en P.J. Thomas. An androgen receptor in rat brain and pituitary. Brain Res. 1975, 100, 383-393.
- Bartke, A., R.E. Steele, N. Musto en B.V. Caldwell. Fluctuations in plasma testosterone levels in adult rats and mice. Endocrinology 1973, 92, 1223-1228.
- Bartke, A. en J.K. Voglmayr. Effects of gonadotropins

- on androgen levels in rete testis fluid of the ram. Biol. Reprod. 1977, 16, 274-280.
- Baum, M.J., P. Södersten en J.T.M. Vreeburg. Mounting and receptive behavior in the ovariectomized female rat: influence of estradiol, dihydrotestosterone, and genital anesthetization. Horm. Behav. 1974, 5, 175-190.
- Baum, M.J. en J.T.M. Vreeburg. Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. Science 1973, 182, 283-285.
- Baum, M.J. en J.T.M. Vreeburg. Differential effects of the anti-estrogen MER-25 and of three 5 α -reduced androgens on mounting and lordosis behavior in the rat. Horm. Behav. 1976, 7, 87-104.
- Beach, F.A. en G. Levinson. Effects of androgen on the glans penis and mating behavior of castrated male rats. J. exp. Zool. 1950, 114, 159-168.
- Bedford, J.M. Development of fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. J. exp. Zool. 1966, 163, 319-330.
- Bedford, J.M. Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. J. exp. Zool. 1967, 166, 271-282.
- Bedford, J.M. Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. In: Handbook of physiology, section 7, Endocrinology, vol. 5, pp. 303-318. Eds. R.O. Greep en D.W. Hamilton. Washington: Am. Phys. Soc., 1975.
- Bedford, J.M., H. Calvin en G.W. Cooper. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J. Reprod. Fert. 1973, suppl. 18, 199-213.
- Berthold, A.A. Transplantation der Hoden. Arch. Anat. Physiol. wiss. Med. 1849, 16, 42-46.
- van Beurden-Lamers, W.M.O., A.O. Brinkmann, E. Mulder en H.J. van der Molen. High-affinity binding of oestradiol-17 β by cytosols from testis interstitial tissue, pituitary, adrenal, liver and accessory sex glands of the male rat. Biochem. J. 1974, 140, 495-502.
- Beyer, C., L. de la Torre, K. Larsson en G. Pérez-Palacios. Synergistic actions of estrogen and androgen on the sexual behavior of the castrated male rabbit. Horm. Behav. 1975, 6, 301-306.
- Bishop, M.W.H. en H. Walton. Metabolism and motility of mammalian spermatozoa. In: Marshall's physiology of reproduction, vol. 1, part 2, p. 264. Ed. A.W. Parkes. London: Green, 1960.

- Blandau, R.J. en D.L. Odor. The total number of spermatozoa reaching various segments of the reproductive tract in the female albino rat at intervals after insemination. Anat. Rec. 1949, 103, 93-109.
- Blandau, R.J. en R.E. Rumery. The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. Fert. Steril. 1964, 15, 571-579.
- Blaquier, J.A. en R.S. Calandra. Intranuclear receptor for androgens in rat epididymis. Endocrinology 1973, 93, 51-60.
- Bloch, G.J. en J.M. Davidson. Behavioral and somatic responses to the anti-androgen cyproterone. Horm. Behav. 1971, 2, 11-25.
- Brooks, D.E. Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. Biochem. J. 1976, 156, 527-537.
- Brooks, D.E., D.W. Hamilton en A.H. Mallek. The uptake of L-(methyl-³H)-carnitine by the rat epididymis. Biochem. biophys. Res. Commun. 1973, 52, 1354-1360.
- Brooks, D.E., D.W. Hamilton en A.H. Mallek. Carnitine and glycerylphosphorylcholine in the reproductive tract of the male rat. J. Reprod. Fert. 1974, 36, 141-160.
- Brotherton, J. The counting and sizing of spermatozoa from ten animal species using a Coulter Counter. Andrologia 1975, 7, 169-185.
- Brown-Grant, K. Failure of ovulation after administration of steroid hormones and hormone antagonists to female rats during the neonatal period. J. Endocr. 1974, 62, 683-684.
- Bruchovski, N. en J.D. Wilson. The intranuclear binding of testosterone and 5 α -androstane-17 β -ol-3-one by rat prostate. J. biol. Chem. 1968, 243, 5953-5960.
- Burgos, M.H. en E.S. Tovar. Sperm motility in the rat epididymis. Fert. Steril. 1974, 25, 985-991.
- Calandra, R.S. E.J. Podestá, M.A. Rivarola en J.A. Blaquier. Tissue androgens and androphilic proteins in rat epididymis during sexual development. Steroids 1974, 24, 507-518.
- Challis, J.R.G., C.K. Kim, F. Naftolin, H.L. Judd, S.S. C. Yen en K. Benirschke. The concentrations of androgens, oestrogens, progesterone and luteinizing hormone in the serum of the foetal calves throughout the course of gestation. J. Endocr. 1974, 60, 107-115.

- Chang, C.C. en F.A. Kincl. Sustained release hormonal preparation: 4. Biologic effectiveness of steroid hormones. Fert. Steril. 1970, 21, 134-139.
- Clark, J.H., P.S. Campbell en E.J. Peck. Receptor-estrogen complex in the nuclear fraction of the pituitary and hypothalamus of male and female immature rats. Neuroendocrinology 1972, 77, 218-228.
- Cochran, C.A. en A.A. Perachio. Dihydrotestosterone propionate effects on dominance and sexual behaviors in gonadectomized male and female Rhesus monkeys. Horm. Behav. 1977, 8, 175-187.
- Comhaire, F.H. en A. Vermeulen. Testosterone concentration in the fluids of seminiferous tubules, the interstitium and the rete testis of the rat. J. Endocr. 1976, 70, 229-235.
- Cooper, K.K. Cutaneous mechanoreceptors of the glans penis of the cat. Physiol. Behav. 1972, 8, 793-796.
- Cooper, T.G. en G.M.H. Waites. Testosterone in rete testis fluid and blood of rams and rats. J. Endocr. 1974, 62, 619-629.
- Corpéchet, C., B. Eychenne en P. Robel. Simultaneous radioimmunoassay of testosterone, dihydrotestosterone 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol and 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol in the plasma of adult male rats. Steroids 1977, 29, 503-516.
- Coyupta, J., A.F. Parlow en N. Kovacic. Serum testosterone and dihydrotestosterone levels following orchidectomy in the adult rat. Endocrinology 1973, 92, 1579-1581.
- Damsté, P.H. Experimental modification of the sexual cycle of the greenfinch. J. exp. Biol. 1947, 24, 20-35.
- David, K., E. Dingemanse, J. Freud en E. Laqueur. Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 1935, 233, 281-282.
- Davies, J., F. Naftolin, K.J. Ryan, J. Fishman en J. Siu. The affinity of catechol estrogens for estrogen receptors in the pituitary and anterior hypothalamus of the rat. Endocrinology 1975, 97, 554-557.
- Denef, C., C. Magnus en B.S. McEwen. Sex differences and hormonal control of testosterone metabolism in rat pituitary and brain. J. Endocr. 1973, 59, 605-621.
- Denef, C., C. Magnus en B.S. McEwen. Sex-dependent changes in pituitary 5 α -dihydrotestosterone and 3 α -

- androstenediol formation during postnatal development and puberty in the rat. Endocrinology 1974, 94, 1265-1274.
- Djøseland, O. Androgen metabolism by rat epididymis. 3. Effect of castration and anti-androgens. Steroids 1976, 27, 47-64.
- Djøseland, O., V. Hansson en H.N. Haugen. Androgen metabolism by rat epididymis. 1. Metabolic conversion of ^3H -testosterone in vivo. Steroids 1973, 21, 773-783.
- Djøseland, O., V. Hansson en H.N. Haugen. Androgen metabolism by rat epididymis. 2. Metabolic conversion of ^3H -testosterone in vitro. Steroids 1974, 23, 397-410.
- Djøseland, O., C.D. Hastings en V. Hansson. Androgen metabolism by rat epididymis. 5. Metabolic conversion and nuclear binding after injection of 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, in vivo. Steroids 1976, 28, 585-596.
- Dyson, A.L.M.B. en M.-C. Orgebin-Crist. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. Endocrinology 1973, 93, 391-402.
- Eisenfeld, A.J. en J. Axelrod. Selectivity of estrogen distribution in tissues. J. Pharmac. exp. Ther. 1965, 150, 469-475.
- Eisenfeld, A.J. en J. Axelrod. Effect of steroid hormones, ovariectomy, estrogen pretreatment, sex and immaturity on the distribution of ^3H -estradiol. Endocrinology 1966, 79, 38-42.
- Emery, D.E. en B.D. Sachs. Ejaculatory pattern in female rats without androgen treatment. Science 1975, 190, 484-486.
- Farnsworth, W.E. en J.R. Brown. Testosterone metabolism in the prostate. Nat. Cancer Inst. Monogr. 1963, 12, 323-325.
- Feder, H.H., F. Naftolin en K.J. Ryan. Male and female sexual responses in male rats given oestradiol benzoate and 5α -androstane- 17β -ol-3-one propionate. Endocrinology 1974, 94, 136-141.
- Fiorelli, G., D. Borrelli, G. Forti, P. Gonnelli, M. Pazzagli en M. Serio. Simultaneous determination of androstenedione, testosterone and 5α -dihydrotestosterone in human spermatic and peripheral venous plasma. J. Ster. Biochem. 1976, 7, 113-116.
- Fletcher, T.J. en R.V. Short. Restoration of libido in

- castrated red deer stag (*Cervus elaphus*) with oestradiol-17 β . Nature 1974, 248, 616-618.
- Folman, Y., J.G. Sowell en K.B. Eik-Nes. The presence and formation of 5 α -dihydrotestosterone in rat testes in vivo and in vitro. Endocrinology 1972, 91, 702-710.
- Forest, M.G., P.C. Sizonenko, A.M. Cathiard en J. Bertrand. Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. I. Evidence for testicular activity in early infancy. J. clin. Invest. 1974, 53, 819-828.
- Fox, T.O. Conversion of the hypothalamic estradiol receptor to the 'nuclear' form. Brain Res. 1977, 120, 580-583.
- Fray, C.S., A.P. Hoffer en D.W. Fawcett. A reexamination of motility patterns of rat epididymal spermatozoa. Anat. Rec. 1972, 173, 301-308.
- Free, M.J., G.A. Schluntz en R.A. Jaffe. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. Biol. Reprod. 1976, 14, 481-488.
- French, F.S. en E.M. Ritzén. Androgen-binding protein in efferent duct fluid of rat testis. J. Reprod. Fert. 1973 (a), 32, 479-483.
- French, F.S. en E.M. Ritzén. A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. Endocrinology 1973 (b), 93, 88-95.
- Ganjam, V.K. en R.P. Amann. Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue and accessory sex gland secretions. Endocrinology 1976, 99, 1618-1630.
- Ginsburg, M., B.D. Greenstein, N.J. MacLusky, I.D. Morris en P.J. Thomas. An improved method for the study of high-affinity steroid binding: oestradiol binding in brain and pituitary. Steroids 1974, 23, 773-792.
- Ginsburg, M., B.D. Greenstein, N.J. MacLusky, I.D. Morris en P.J. Thomas. Occurrence and properties of 17 β -estradiol receptors in rat brain. J. Ster. Biochem. 1975, 6, 989-991.
- Goodman, L. Observations on transplanted immature ovaries in the eyes of adult male and female rats. Anat. Rec. 1934, 59, 223-252.
- Gorski, R.A. Modification of the ovulatory mechanisms by postnatal administration of estrogen to the rat. Am. J. Physiol. 1963, 205, 842-844.
- Granick, S. en A. Kappas. Steroid induction of porphyrin

- synthesis in liver cell culture. J. biol. Chem. 1967, 242, 4587-4593.
- Guerrero, R., E.M. Ritzén, K. Purvis, V. Hansson en F.S. French. Concentration of steroid hormones and androgen binding protein (ABP) in rabbit efferent duct fluid. In: Current topics in molecular endocrinology, vol. 2, Hormonal regulation of spermatogenesis, pp. 213-221. Eds. F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzén en S.N. Nayfeh. New York en Londen: Plenum Press, 1975.
- Gupta, D., K. Rager, J. Zarzycki en M. Eichner. Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism. J. Endocr. 1975, 66, 183-193.
- Gupta, G., M. Rajalakshmi, M.R.N. Prasad en N.R. Moudgal. Alteration of epididymal function and its relation to maturation of spermatozoa. Andrologia 1974, 6, 35-44.
- Hamilton, D.W. en D.W. Fawcett. In vitro synthesis of cholesterol and testosterone from acetate by rat epididymis and vas deferens. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1970, 133, 693-695.
- Hamilton, J.B. The role of testicular secretions as indicated by the effects of castration in man and by studies of pathological conditions and the short lifespan associated with maleness. Rec. Progr. Horm. Res. 1948, 3, 257-322.
- Hammerstedt, R.H. en R.P. Amann. Interconversions of steroids by intact bovine sperm and epididymal tissue. Biol. Reprod. 1976, 15, 686-694.
- Hammond, G.L., A. Ruokonen, M. Kontturi, E. Koskela en R. Vihko. The simultaneous radioimmunoassay of seven steroids in human spermatic and peripheral venous blood. J. clin. Endocr. Metab. 1977, 16, 16-24.
- Hammond, J. en S.A. Asdell. The vitality of the spermatozoa in the male and female reproductive tracts. Br. J. exp. Biol. 1926, 4, 155-185.
- Hansson, V. Further characterization of the 5 α -dihydrotestosterone binding protein in the epididymal cytosol fraction. In vitro studies. Steroids 1972, 20, 575-596.
- Hansson, V., O. Djøseland, E. Reusch, A. Attramadal en O. Torgersen. Intracellular receptors for 5 α -dihydrotestosterone in the epididymis of adult rats. Comparison with the androgenic receptors in the ventral prostate and the androgen binding protein (ABP) in testicular and epididymal fluid. Steroids 1973, 22, 19-33.

- Hansson, V., O. Trygstad, F.S. French, W.S. McLean, A.A. Smith, D.J. Tindall, S.C. Weddington, P. Petrusz, S.N. Nayfeh en E.M. Ritzén. Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. Nature 1974, 250, 387-391.
- Harris, G.W. The induction of ovulation in the rabbit, by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophysial mechanism. Proc. Roy. Soc. B. 1937, 122, 374-394.
- Harris, G.W. Regulation of gonadotrophic secretion from the anterior pituitary gland. In: Neural control of the pituitary gland, pp. 60-102. Londen: Arnold, 1955.
- Harris, G.W. Sex hormones, brain development and brain function. Endocrinology 1964, 95, 627-648.
- Harris, M.E. en A. Bartke. Maintenance of rete testis fluid testosterone and dihydrotestosterone levels by pregnenolone and other C₂₁ steroids in hypophysectomized rats. Endocrinology 1975, 96, 1396-1402.
- Hoffman, L.H., N. Jahad en M.-C. Orgebin-Crist. The effects of testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, 3 α -androstane-10 β -diol, and 3 β -androstane-10 β -diol on epithelial fine structure of the rabbit epididymis in organ culture. Cell Tiss. Res. 1976, 167, 493-514.
- Holtz, W. en D. Smidt. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. J. Reprod. Fert. 1976, 46, 227-229.
- Horan, A.H. en J.M. Bedford. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. J. Reprod. Fert. 1972, 30, 417-423.
- Inano, H., A. Machino en B.I. Tamaoki. In vitro metabolism of steroid hormones by cell-free homogenates of epididymides of adult rats. Endocrinology 1969, 84, 997-1003.
- Jaffe, R.B. Testosterone metabolism in target tissues: hypothalamic and pituitary tissues of the adult rat and human fetus, and the immature rat epiphysis (1). Steroids 1969, 14, 483-498.
- Jones, R. Effects of testosterone, testosterone metabolites and anti-androgens on the function of the male accessory glands in the rabbit and rat. J. Endocr. 1977, 74, 75-88.
- Jones, R. en T.D. Glover. The effects of castration on the composition of rabbit epididymal plasma. J. Reprod. Fert. 1973, 34, 405-414.
- de Jong, F.H., A.H. Hey en H.J. van der Molen. Effect

- of gonadotrophins on the secretion of oestradiol-17 β and testosterone by the rat testis. J. Endocr. 1973, 57, 277-284.
- de Jong, F.H., J.Th.J. Uilenbroek en H.J. van der Molen. Oestradiol-17 β , testosterone and gonadotrophins in oestradiol-17 β treated intact adult male rats. J. Endocr. 1975, 65, 281-282.
- Joshi, H.S. en J.I. Raeside. Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behavior of the boar. J. Reprod. Fert. 1973, 33, 411-423.
- Jouan, P., S. Samperez, M.-L. Thieulant en L. Mercier. Etude du récepteur cytoplasmique de la (1,2-3H) testostérone dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus du rat. J. Ster. Biochem. 1971, 2, 223-236.
- Kato, J. The role of hypothalamic and hypophyseal 5 α -dihydrotestosterone, estradiol and progesterone receptors in the mechanism of feedback action. J. Ster. Biochem. 1975, 6, 979-987.
- Kato, J. en T. Onouchi. 5 α -Dihydrotestosterone 'receptor' in the rat hypothalamus. Endocr. jap. 1973, 20, 429-432.
- King, R.J.B. en W.I.P. Mainwaring. Steroid cell interactions. Londen: Butterworth, 1974.
- Knorr, D., F. Bidlingmaier, O. Butenandt, H. Fendel en R. Ehrh-Wehle. Plasma testosterone in male puberty. I. Physiology of plasma testosterone. Acta endocr. Copnh. 1974, 75, 181-194.
- Korach, K.S. en T.G. Muldoon. Characterization of the interaction between 17 β -estradiol and its cytoplasmic receptor in the rat anterior pituitary gland. Biochemistry 1974, 13, 1932-1938.
- Koskimies, A.I. en M. Kormanio. Proteins in fluids from different segments of the rat epididymis. J. Reprod. Fert. 1975, 43, 345-348.
- Krieg, M. en K.D. Voigt. Biochemical substrate of androgenic actions at a cellular level in prostate, bulbocavernosus/levator ani and in skeletal muscle. Acta endocr. Copnh., 1977, suppl. 214, 43-89.
- Larsson, K., P. Södersten en C. Beyer. Induction of male sexual behaviour by oestradiol benzoate in combination with dihydrotestosterone. J. Endocr. 1973, 57, 563-564.
- Lasnitzki, I. en H.R. Franklin. The influence of serum on the uptake, conversion and action of dihydrotestosterone in rat prostate glands in organ culture. J.

- Endocr. 1975, 64, 289-297.
- Leatham, J.H. en B.J. Brent. Influence of pregnenolone and pregnenolone on spermatogenesis in hypophysectomized adult rats. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1943, 52, 341-343.
- Levine, N. en D.J. Marsh. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. J. Physiol. 1971, 213, 557-570.
- Levy, C., M. Marchut, E.E. Baulieu en P. Robel. Studies of the 3β -hydroxysteroid oxidoreductase activity in rat ventral prostate. Steroids 1974, 23, 291-300.
- Lieberburg, I., N.J. MacLusky en B.S. McEwen. 5α -Dihydrotestosterone (DHT) receptors in rat brain and pituitary cell nuclei. Endocrinology 1977, 100, 598-607.
- Lieberburg, I. en B.S. McEwen. Estradiol- 17β : a metabolite of testosterone recovered in cell nuclei from limbic areas of neonatal rat brains. Brain Res. 1975 (a), 85, 165-170.
- Lieberburg, I. en B.S. McEwen. Estradiol- 17β : a metabolite of testosterone recovered in cell nuclei from limbic areas of adult male rat brains. Brain Res. 1975 (b), 91, 171-174.
- Lieberburg, I. en B.S. McEwen. Brain cell nuclear retention of testosterone metabolites, 5α -dihydrotestosterone and estradiol- 17β , in adult rats. Endocrinology 1977, 100, 588-597.
- Lieberburg, I., G. Wallach en B.S. McEwen. The effects of an inhibitor of aromatization (1,4,6-androstatriene-3,17-dione) and an anti-estrogen (CI-628) on in vivo formed testosterone metabolites recovered from neonatal rat brain tissues and purified cell nuclei. Implications for sexual differentiation of the rat brain. Brain Res. 1977, 128, 176-181.
- Lincoln, G.A. An effect of the epididymis on the growth of antlers of castrated red deer. J. Reprod. Fert. 1975, 42, 159-161.
- Ljunggren, H. Sex differences in body composition. In: Human body composition, pp. 129-138. Ed. J. Brozek. Oxford: Pergamon, 1965.
- Lodder, J. en M.J. Baum. Facilitation of mounting behavior by dihydrotestosterone propionate in castrated estradiol benzoate-treated male rats following pudendectomy. Behav. Biol. 1977, 20, 141-148.
- Lodder, J. en G.H. Zeilmaker. Effects of pelvic nerve and pudendal nerve transection on mating behavior in

- the male rat. Physiol Behav. 1976, 16, 745-751.
- Lubicz-Nawrocki, C.M. The effect of metabolites of testosterone on the viability of hamster epididymal spermatozoa. J. Endocr. 1973, 58, 193-198.
- Lubicz-Nawrocki, C.M., N.I.F. Lau en M.C. Chang. The fertilizing life of spermatozoa in the cauda epididymidis of mice and hamsters. J. Reprod. Fert. 1973, 35, 165-168.
- Ludvik, W. Grundzüge moderner Androgen Behandlung. Der Urologe 1970, 9, 41-43.
- Lutge, W.G. en N.R. Hall. Differential effectiveness of testosterone and its metabolites in the induction of male sexual behavior in two strains of albino mice. Horm. Behav. 1973, 4, 31-43.
- Maneely, R.B. Epididymal structure and function: a historical and critical review. Acta Zool. 1959, 40, 1-21.
- Marshall, F.H.A. en E.B. Verney. The occurrence of ovulation and pseudopregnancy in the rabbit as a result of nervous stimulation. J. Physiol. 1936, 86, 327-336.
- Masson, G. The spermatogenic activity of Δ^5 -pregnenolone and of its esters. Am. J. Med. Sci. 1946, 212, 1-6.
- McDonald, P., C. Beyer, F. Newton, B. Brien, R. Baker, H.S. Tan, C. Sampson, P. Kitching, R. Greenhill en D. Pritchard. Failure of 5 α -dihydrotestosterone to initiate sexual behaviour in the castrated male rat. Nature 1970, 227, 964-965.
- McDonald, P.G. en C. Doughty. Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. J. Reprod. Fert. 1972 (a), 30, 55-62.
- McDonald, P.G. en C. Doughty. Inhibition of androgen-sterilization in the female rat by administration of an anti-oestrogen. J. Endocr. 1972 (b), 55, 455-456.
- McGuire, J.S., V.W. Hollis en G.M. Tomkins. Some characteristics of the microsomal steroid reductases (5 α) of rat liver. J. Biol. Chem. 1960, 235, 3112-3117.
- Mercier, L., C. le Guellec en M.L. Thieulant. Androgen and estrogen receptors in the cytosol from male rat anterior hypophysis: further characteristics and differentiation between androgen and estrogen receptors. J. Ster. Biochem. 1976, 7, 779-785.
- Mester, J. en E.E. Baulieu. Nuclear estrogen receptor

- of chick liver. Biochim. Biophys. Acta 1972, 261, 236-244.
- Minguell, J. en L. Valladares. Molecular aspects on the mechanism of action of testosterone in rat bone marrow cells. J. Ster. Biochem. 1974, 5, 649-654.
- Moore, C.R. en D. Price. Gonad hormone functions, and reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism. Am. J. Anat. 1932, 50, 13-71.
- Naess, O. Characterization of the androgen receptors in the hypothalamus, preoptic area and brain cortex of the rat. Steroids 1976, 27, 167-185.
- Naess, O., A. Attramadal en A. Aakvaag. Androgen binding proteins in the anterior pituitary, hypothalamus, preoptic area and brain cortex of the rat. Endocrinology 1975, 96, 1-9.
- Naftolin, F., K.J. Ryan, I.J. Davies, V.V. Reddy, F. Flores, Z. Petro, M. Kuhn, R.J. White, Y. Takaoka en L. Wolin. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. Rec. Progr. horm. Res. 1975, 31, 295-319.
- Naftolin, F., K.J. Ryan en Z. Petro. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. J. clin. Endo. Metab. 1971, 33, 368-370.
- Naftolin, F., K.J. Ryan en Z. Petro. Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. Endocrinology 1972, 90, 295-298.
- Ogren, L., M. Vértés en D. Woolley. In vivo nuclear ³H-estradiol binding in brain areas of the rat: reduction by endogenous and exogenous androgens. Neuroendocrinology 1976, 21, 350-365.
- Orgebin-Crist, M.-C. Passage of spermatozoa labelled with thymidine-³H through the ductus epididymidis of the rabbit. J. Reprod. Fert. 1965, 10, 241-251.
- Orgebin-Crist, M.-C. Sperm maturation in rabbit epididymis. Nature 1967, 216, 816-818.
- Orgebin-Crist, M.-C., B.J. Danzo en J. Davies. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Handbook of physiology, vol. 5, pp. 319-338. Eds. R.O. Greep en D.W. Hamilton. Washington: Am. Phys. Soc., 1975.
- Owen, K., P.J. Peters en F.H. Bronson. Effects of intracranial implants of testosterone propionate on intermale aggression in the castrated male mouse. Horm. Behav. 1974, 5, 83-92.

- Pérez-Palacios, G., E. Castañeda, F. Gómez-Pérez, A.E. Pérez en C. Gual. In vitro metabolism of androgens in dog hypothalamus, pituitary, and limbic system. Biol. Reprod. 1970, 3, 205-213.
- Pfaff, D.W. Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: specificity of effects and individual patterns of response. J. comp. physiol. Psychol. 1970, 73, 349-358.
- Pfeiffer, C.A. Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads. Am. J. Anat. 1936, 58, 195-225.
- Podestá, E.J., R.S. Calandra, M.A. Rivarola en J.A. Blaquier. The effect of castration and testosterone replacement on specific proteins and androgen levels of the rat epididymis. Endocrinology 1975, 95, 399-405.
- Podestá, E.J. en M.A. Rivarola. Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules, and interstitial tissue of rats at different stages of development. Endocrinology 1974, 95, 455-461.
- Pujol, A., F. Bayard, J. Louvet en C. Boulard. Testosterone and dihydrotestosterone concentrations in plasma, epididymal tissues, and seminal fluid of adult rats. Endocrinology 1976, 98, 111-113.
- Purvis, K., R. Calandra, E. Haug en V. Hansson. 5 α -Reduced androgens and testicular function in the immature rat: effects of 5 α -androstane-17 β -ol-3-one (DHT) propionate and 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol. Mol. Cell. Endocr. 1977, 7, 203-219.
- Purvis, K. en V. Hansson. Androgens and androgen binding protein (ABP) in the rat epididymis. Acta endocr. Copnh. 1977, suppl. 212, 211.
- Reddy, V.V.R., F. Naftolin en K.J. Ryan. Conversion of androstenedione to estrone by neural tissues from fetal and neonatal rats. Endocrinology 1974, 94, 117-121.
- Resko, J.A., H.H. Feder en R.W. Goy. Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats. J. Endocr. 1968, 40, 485-491.
- Resko, J.A., A. Malley, D. Begley en D.L. Hess. Radioimmunoassay of testosterone during fetal development of the Rhesus monkey. Endocrinology 1973, 93, 156-161.
- Reyes, F.I., R.S. Boroditsky, J.S.D. Winter en C. Faiman. Studies on human sexual development. II. Fetal and maternal serum gonadotropin and sex steroid concentrations. J. clin. Endocr. Metab. 1974, 38, 612-617.
- Rigaudière, N. en M.E. Wolff. Evolution des teneurs en

- testostérone et dihydrotestostérone dans le plasma, le testicule et l'ovaire chez le Cobaye au cours de la vie foetale. C.R. Acad. Sc. Paris, D, 1977, 285, 989-992.
- Ritzén, E.M., S.N. Nayfeh, F.S. French en M.C. Dobbins. Demonstration of androgen-binding components in rat epididymis cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues. Endocrinology 1971, 89, 143-151.
- Robel, P., C. Corpéchet en E.E. Baulieu. Testosterone and androstanolone in rat plasma and tissues. FEBS letters 1973, 33, 218-220.
- Robel, P., I. Lasnitzki en E.E. Baulieu. Hormone metabolism and action: testosterone and metabolites in prostate organ culture. Biochimie 1971, 53, 81-96.
- Rommerts, F.F.G., J.A. Grootegoed en H.J. van der Molen. Physiological role for androgen binding protein-steroid complex in testis? Steroids 1976, 28, 43-49.
- Rommerts, F.F.G. en H.J. van der Molen. Occurrence and localization of 5 α -steroid reductase, 3 α - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in hypothalamus and other brain tissues of the male rat. Biochim. Biophys. Acta 1971, 248, 489-502.
- Rowley, M.J., F. Teshima en C.G. Heller. Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. Fert. Steril. 1970, 21, 390-396.
- Schwarzal, W.C., W.G. Kruggel en H.J. Brodie. Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. VIII. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta. Endocrinology 1973, 92, 866-880.
- Selye, H. Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of steroids. Endocrinology 1942, 30, 437-453.
- Setchell, B.P., G.M.H. Waites en A.R. Till. Variations in flow of blood within the epididymis and testis of the sheep and rat. Nature 1964, 203, 317-318.
- Shimazaki, J., T. Horaguchi, Y. Ohki en K. Shida. Properties of testosterone 5 α -reductase of purified nuclear fraction from ventral prostate of rats. Endocr. jap. 1971, 18, 179-187.
- Sholiton, L.J., I.L. Hall en E.E. Werk. The iso-polar metabolites produced by incubation of (4-¹⁴C) testosterone with rat and bovine brain. Acta endocr. Copnh. 1970, 63, 512-518.
- Sholiton, L.J. en E.E. Werk. The less-polar metabolites produced by incubation of testosterone-4-¹⁴C with rat and bovine brain. Acta endocr. Copnh. 1969,

- 61, 641-648.
- Steinberger, E., A.K. Chowdhury, R.K. Tcholakian en H. Roll. Effects of C₂₁ steroids on sex accessory organs and testes of mature hypophysectomized rats. Endocrinology 1975, 96, 1319-1323.
- Stewart-Bentley, M., W. Odell en R. Horton. The feedback control of luteinizing hormone in normal adult men. J. clin. Endocr. Metab. 1974, 38, 545-553.
- Swerdloff, R.S. en P.C. Walsh. Testosterone and oestradiol suppression of LH and FSH in adult male rats: duration of castration, duration of treatment and combined treatment. Acta endocr. Copnh. 1973, 73, 11-21.
- Swerdloff, R.S., P.S. Walsh en W.D. Odell. Control of LH and FSH secretion in the male: evidence that aromatization of androgens to estradiol is not required for inhibition of gonadotropin secretion. Steroids 1972, 20, 13-22.
- Tanner, J.M. Radiographic studies of body composition. In: Human body composition, pp. 211-238. Ed. J. Brozek. Oxford: Pergamon, 1965.
- Tesh, J.M. en T.D. Glover. Ageing of rabbit spermatozoa in the male tract and its effect on fertility. J. Reprod. Fert. 1969, 20, 287-297.
- Tindall, D.J., F.S. French en S.N. Nayfeh. Androgen uptake and binding in rat epididymal nuclei, in vivo. Biochem. biophys. Res. Commun. 1972, 49, 1391-1397.
- Tindall, D.J., V. Hansson, W.S. McLean, E.M. Ritzén, S.N. Nayfeh en F.S. French. Androgen-binding proteins in rat epididymis: properties of a cytoplasmic receptor for androgen similar to the androgen receptor in ventral prostate and different from androgen-binding protein (ABP). Mol. Cell. Endocr. 1975, 3, 83-101.
- Tournade, A. Différence de motilité des spermatozoïdes prélevés dans les divers segments de l'épididyme. C.R. Soc. Biol. 1913, 74, 738-739.
- Tuck, R.R., B.P. Setchell, G.M.H. Waites en J.A. Young. The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. Pflügers Arch. 1970, 318, 225-243.
- Turner, T.T., P.K. Hartmann en S.S. Howards. In vivo sodium, potassium, and sperm concentrations in the rat epididymis. Fert. Steril. 1977, 28, 191-195.
- Vague, J., P. Rubin, J. Jubelin, G. Lam-Van, F. Aubert,

- A.M. Wasserman en J. Fondarai. Regulation of the adipose mass: histometric and anthropometric aspects. In: The regulation of the adipose tissue mass, pp. 298-310. Eds. J. Vague en J. Boyer. Amsterdam: Excerpta Medica, 1974.
- Verjans, H.L. en K.B. Eik-Nes. Effects of androstanes, 5 α -androstanes, 5 β -androstanes, oestrenes and oestratrienes on serum gonadotrophin levels and ventral prostate weights in gonadectomized adult male rats. Acta endocr. Copnh. 1976, 83, 201-210.
- Verjans, H.L., K.B. Eik-Nes, J.H. Aafjes, F.J.M. Vels en H.J. van der Molen. Effects of testosterone propionate, 5 α -dihydrotestosterone propionate and oestradiol benzoate on serum levels of LH and FSH in the castrated adult male rat. Acta endocr. Copnh. 1974, 77, 643-654.
- Voglmayr, J.K., N.A. Musto, S.K. Saksena, P.D.C. Brown-Woodman, P.B. Marley en I.G. White. Characteristics of semen collected from the cauda epididymidis of conscious rams. J. Reprod. Fert. 1977, 49, 245-251.
- Voigt, W. en S.L. Hsia. The antiandrogenic action of 4-androsten-3-one-17 β -carboxylic acid and its methyl ester on hamster flank organ. Endocrinology 1973, 92, 1216-1222.
- Vreeburg, J.T.M. Distribution of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone in rat epididymis and their concentrations in efferent duct fluid. J. Endocr. 1975, 67, 203-210.
- Vreeburg, J.T.M. en J.H. Aafjes. Dihydrotestosterone (5 α -androstan-17 β -ol-3-one) in the epididymis of rats. In: Current problems in fertility, pp. 203-206. Eds. A. Ingelman-Sundberg en N.O. Lunell. New York: Plenum Press, 1971.
- Vreeburg, J.T.M., M.V. van Anandel, W.J. Kort en D.L. Westbroek. The effect of hemicastration on daily sperm output in the rat as measured by a new method. J. Reprod. Fert. 1974, 41, 355-359.
- Vreeburg, J.T.M., M. Bielska en M. Ooms. Maturation and survival of spermatozoa in the epididymis of pregnenolone treated hypophysectomized rats. Endocrinology 1976, 99, 824-830.
- Vreeburg, J.T.M. en H.R. Scholte. Localization of 5 α -steroid reductase in the epididymis of the rat. Acta endocr. Copnh. 1973, suppl. 177, 67.
- Vreeburg, J.T.M., P.J.M. Schretlen en M.J. Baum. Specific, high-affinity binding of 17 β -estradiol in cytosols from several brain regions and pituitary of intact and castrated adult male rats. Endocrinology

- 1975, 97, 969-977.
- Vreeburg, J.T.M., P.D.M. van der Vaart en P. van der Schoot. Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. J. Endocr. 1977, 74, 375-382.
- Vreeburg, J.T.M., P.J.A. Woutersen, M.P. Ooms en J.J. van der Werff ten Bosch. Plasma androgens in fetal guinea pigs after infusion of radioactive testosterone into their mother. Acta endocr. Copnh. 1977, suppl. 212, 69.
- Wallace, J.C., R.G. Wales en I.G. White. The respiration of the rabbit epididymis and its synthesis of glycerylphosphorylcholine. Austr. J. Biol. Sci. 1966, 19, 849-856.
- Weinstein, R.L., R.P. Kelch, M.R. Jenner, S.L. Kaplan en M.M. Grumbach. Secretion of unconjugated androgens and estrogens by the normal and abnormal human testis before and after human chorionic gonadotropin. J. clin. Invest. 1974, 53, 1-6.
- Weisz, J. en C. Gibbs. Conversion of testosterone and androstenedione to estrogens in vitro by the brain of female rats. Endocrinology 1974, 94, 616-620.
- van der Werff ten Bosch, J.J. Testosterone as growth stimulant in man. Pharmac. Ther. C. 1977, 2, 17-32.
- West, C.D., V.P. Hollander, T.H. Kritchevski en K. Dobriner. The isolation and identification of testosterone, Δ^4 -androstenedione, and 7-ketocholesterol from spermatic vein blood. J. clin. Endocr. Metab. 1952, 12, 915.
- Whalen, R.E., C. Battie en W.G. Luttge. Anti-estrogen inhibition of androgen induced sexual receptivity in rats. Behav. Biol. 1972, 7, 311-320.
- Whalen, R.E. en J.F. DeBold. Comparative effectiveness of testosterone, androstenedione, and dihydrotestosterone in maintaining mating behavior in the castrated male hamster. Endocrinology 1974, 95, 1674-1679.
- Whalen, R.E. en R.D. Nadler. Suppression of the development of female mating behavior by estrogen administered in infancy. Science 1963, 141, 273-274.
- White, I.G. en B. Hudson. The testosterone and dehydroepiandrosterone concentration in fluids of the mammalian male reproductive tract. J. Endocr. 1968, 41, 291-292.
- Widdowson, E.M. Changes in body proportions and composition during growth. In: Scientific foundations of paediatrics, pp. 44-55. Eds. J.A. Davis en J. Dobbing.

- Londen: Heinemann, 1974.
- Williams-Ashman, H.G. Metabolic effects of testicular androgens. In: Handbook of physiology, section 7, Endocrinology, vol. 5, pp. 473-490. Eds. R.O. Greep en D.W. Hamilton. Washington: Am. Phys. Soc., 1975.
- Wilson, E.M. en F.S. French. Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate. J. biol. Chem. 1976, 251, 5620-5629.
- Wyker, R. en S.S. Howards. Micropuncture studies of the motility of rete testis and epididymal spermatozoa. Fert. Steril. 1977, 28, 108-112.
- Young, W.C. A study of the function of the epididymis. I. Is the attainment of full spermatozoon maturity attributable to some specific action of the epididymal secretion? J. Morph. Physiol. 1929, 47, 479-495.
- Young, W.C. A study of the function of the epididymis. III. Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens in the guinea-pig. J. exp. Biol. 1931, 8, 151-162.
- Young, W.C. The hormones and mating behavior. In: Sex and internal secretions, vol. 2, pp. 1173-1239. Ed. W.C. Young. Baltimore: Williams and Wilkins, 1961.
- Young, W.C., R.W. Goy en C.H. Phoenix. Hormones and sexual behavior: broad relationships exist between the gonadal hormones and behavior. Science 1964, 143, 212-218.

TRIVIALE EN SYSTEMATISCHE NAMEN

3 α -androstaandiol	5 α -androstaan-3 α ,17 β -diol
3 β -androstaandiol	5 α -androstaan-3 β ,17 β -diol
androstaandion	5 α -androstaan-3,17-dion
androsteedion	4-androsteen-3,17-dion
androsteron	3 α -hydroxy-5 α -androstaan-17-on
clomipheen	2-(p-(2-chloor-1,2-diphenylvinyl)phenoxy)-thriethylamine
dehydroepiandrosteron	3 β -hydroxy-5-androsteen-17-on
dihydrotestosteron	17 β -hydroxy-5 α -androstaan-3-on
3 α -hydroxysteroiddehydrogenase	3 α -hydroxysteroid: NAD(P)-oxidoreductase (E.C.1.1.50)
MER-25	1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenylethanol
1 α -methyl-dihydrotestosteron	1 α -methyl-17 β -hydroxy-5-androstaan-3-on
oestradiol	1,3,5(10)-oestratrien-3,17 β -diol
oestriol	1,3,5(10)-oestratrien-3,16 α ,17 β -triol
oestron	3-hydroxy-1,3,5(10)-oestratrien-17-on
pregnenolon	3 β -hydroxy-5-pregneen-20-on
progesteron	4-pregneen-3,20-dion
5 α -steroidreductase	5 α -steroid: NAD(P) Δ^4 -oxidoreductase (E.C.1.3.1.99)

testosteron (17 β -hydroxy-4-androsteen-3-on)

AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

DPM	desintegraties per minuut
EDTA	ethyleendiaminetetraazijn- zuur
Eq	equivalent
FSH	follikel stimulerend hor- moon
f	femto (10^{-15})
g	relatieve centrifugale kracht
I.E.	internationale eenheid
Ka	associatie constante
LH	luteïniserend hormoon
ng	nano (10^{-9}) gram
p	overschrijdingskans
RNA	ribonucleïnezuur
S	svedberg eenheid
TRIS	2-amino-2-hydroxymethylpro- paan-1,3-diol
w/v	gewicht per volume

NAWOORD

De androgenen testosteron en dihydrotestosteron komen in bijzonder lage concentraties in het lichaam voor. Wanneer aan het water van een zwembad een vingerhoedje testosteron zou worden toegevoegd, dan zou bij een gelijkmatige verdeling de concentratie van dit hormoon in het water ongeveer gelijk zijn aan de concentratie van testosteron in het bloed van mannen. Het zal duidelijk zijn dat de bepaling van zulke lage steroidconcentraties bijzondere technieken vereist. Ik mag mij dan ook gelukkig prijzen dat Henk van der Molen mij gedegen onderwijs in de toentertijd gangbare gaschromatografische testosteronbepaling heeft willen geven.

Met veel plezier denk ik terug aan de tijd, waarin ik samen met Henny Wolffensperger en Jenny Harms ieder gaschromatogram van epididymis-extracten de gaschromatograaf afkeek. Toen enkele jaren later de afdeling biochemie II overschakelde op radioimmunologische steroidbepalingen, konden wij wederom gebruik maken van hun ervaringen. Marja Ooms en Carla van de Kamp hebben met deze methode een aantal van de in dit proefschrift vermelde getallen geproduceerd.

Hormoongevoelige weefsels kunnen op lage steroidconcentraties reageren doordat zij de beschikking hebben over receptoren die met een hoge affiniteit steroiden kunnen binden. Wanneer de menselijke tong net zulke gevoelige receptoren zou bezitten voor testosteron als de hormoongevoelige weefsels, dan zouden zwemmers het bovengenoemde vingerhoedje testosteron in het zwembad kunnen proeven. Bij het aantonen van steroidreceptoren zijn de adviezen van Eppo Mulder en de vaardigheid van Peter Schretlen van grote betekenis geweest.

De keuze van de in dit proefschrift beschreven on-

derwerpen is niet alleen gemaakt omdat zij mij interesseerden, maar ook omdat deze onderwerpen mij in de gelegenheid stelden samen te werken met Jacob Aafjes en Michael Baum. Terugkijkend op de tijd die ik in de afdeling endocrinologie, groei en voortplanting heb doorgebracht, realiseer ik mij dat ik vrijwel altijd met plezier gewerkt heb, en dat dit in belangrijke mate te danken is aan mijn promotor Koos van der Werff ten Bosch.

CURRICULUM VITAE

Geboren te Leiden op 24 november 1941. Eindexamen gymnasium- β : 1960. Doctoraal-examen chemie te Leiden in 1967 (hoofdvak biochemie, bijvakken organische en klinische chemie). Sedert april 1967 werkzaam in de afdeling endocrinologie, groei en voortplanting, faculteit der geneeskunde, Erasmus Universiteit Rotterdam.