

GESLACHTSVerschillen IN REGULATIE VAN

OVARIUMACTIVITEIT BIJ DE RAT

P.J.C.M. van der Schoot



GESLACHTSVERSCHILLEN IN REGULATIE VAN  
OVARIUMACTIVITEIT BIJ DE RAT

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. C.J. van der Weijden  
en volgens besluit van het college van dekanen.  
De openbare verdediging zal plaatsvinden op  
16 mei 1973, des namiddags te 16.00 uur

door

PIETER JOZEF CORNELIUS MARIA VAN DER SCHOOT  
geboren te Tilburg in 1944



Promotor : Dr. G.H. Zeilmaker

Coreferenten : Dr. L.M. Boot

Prof. Dr. J.J. van der Werff ten Bosch



'One of the most fascinating questions in the physiology of reproduction concerns the process whereby the hypothalamo-hypophyseal apparatus differentiates during fetal or early postnatal life to eventuate after puberty either in the steady "tonic" secretion of gonadotropin characteristic of the male or in the complex cyclic secretion characteristic of the female'

J.W. Everett (1969)





## VOORWOORD

1936 is een belangrijk jaartal in de geschiedenis van het experimenteel-endocrinologisch onderzoek naar de oorzaak van geslachtsverschillen bij zoogdieren. In dat jaar werd definitief afgerekend met het door Steinach's werk ingeburgerde idee van 'sex hormone antagonism' als oorzaak van deze verschillen; Pfeiffer ontdekte aan de hand van ovariumtransplantaten in op verschillende leeftijd gecastreerde mannelijke ratten een principe, dat later een zeer algemene geldigheid bleek te bezitten bij de ontwikkeling van geslachtsverschillen.

Volgens dit principe komen geslachtsverschillen tot stand, doordat op een in mannelijke en vrouwelijke dieren identiek primordium gedurende een kritische ontwikkelingsfase verschillende organiserende factoren inwerken.

Bekendheid met dergelijke kritische ontwikkelingsfasen en de organiserende factoren heeft het mogelijk gemaakt om enerzijds diepgaand inzicht in de mogelijke diversiteit van manifestatie van geslachtsverschillen te verkrijgen, anderzijds om, in proefdieren, op uitgebreide schaal te 'manipuleren' met de ontwikkeling van geslachtsverschillen.

Ondanks uitvoerige studie van het geslachtsverschil, waaraan Pfeiffer dit principe ontdekte, namelijk geslachtsverschil in regulatie van ovariumactiviteit, is het inzicht in de feitelijke gebeurtenissen, welke zich in de kritische ontwikkelingsfase hiervan afspelen, weinig gevorderd.

Als mogelijke oorzaak zou hiervoor kunnen worden aangemerkt, dat het door Pfeiffer gebruikte model, de op verschillende leeftijden gecastreerde mannelijke rat, al spoedig vrijwel geheel vervangen werd door een verondersteld equivalent : de vrouwelijke rat, die in de neonatale levensfase al dan niet 'vermannelijkt' werd door injectie van testosteron-propionaat.

Onderzocht werd, in hoeverre deze veronderstelde equivalentie gevalideerd kon worden door een vergelijkende studie van regulatie van ovulatie en luteale activiteit in op verschillende leeftijd gecastreerde mannelijke ratten en neonataal al dan niet 'vermannelijkte' vrouwelijke ratten. Neonataal gecastreerde mannelijke ratten bleken naast overeenkomsten ook duidelijk herkenbare verschillen te vertonen met vrouwelijke ratten in regulatie van ovariumactiviteit; 'vermannelijkte' vrouwelijke ratten verschilden in alle bestudeerde aspecten van regulatie van luteale activiteit van op volwassen leeftijd gecastreerde mannelijke ratten.



LIJST VAN AFKORINGEN

CZS : *centraal zenuwstelsel*

POA : *de area preoptica in het centrale zenuwstelsel*

VMN : *de ventro-mediale hypothalamus*

AME : *de mediale amygdala*

ECS-POA : *elektrochemische stimulatie van de area preoptica*

ECS-AME : *elektrochemische stimulatie van de mediale amygdala*

ES-VMN : *elektrische stimulatie van de ventromediale hypothalamus*

$\delta\delta$  : *mannelijke dieren*

$\text{♀♀}$  : *vrouwelijke dieren*

(R)-ratten : *ratten van de R-stam (albino)*

(RU)-ratten :  $(\text{♀R} \times \text{♂U})\text{F}_1$  *hybride ratten ('hooded')*

NC- $\delta\delta$  : *neonataal gecastreerde mannelijke ratten*

AC- $\delta\delta$  : *op volwassen leeftijd gecastreerde mannelijke ratten met een ovariumtransplantaat*

TP- $\text{♀♀}$  : *vrouwelijke ratten, die op de vijfde levensdag een injectie met 1250  $\mu\text{g}$  TP kregen*

TP : *testosteron propionaat*

OB : *oestradiolbenzooat*

HCG : *humaan chorion-gonadotropine*

CL : *corpus luteum c.q. corpora lutea*

LQ : *lordose-quotiënt, d.w.z. het percentage der keren, dat op een 'mount' (c.q. mount+thrust, intromissie, ejaculatie) gereageerd wordt met lordose-gedrag*



## ALGEMENE INLEIDING

## GESLACHTSVERSCHILLEN IN REGULATIE VAN GONADE-ACTIVITEIT BIJ DE RAT

De activiteit van gonaden manifesteert zich onder andere in de vorming van geslachtscellen en de afgifte van geslachtshormonen. Deze activiteit wordt geregeld door tal van factoren in het inwendige en in het uitwendige milieu. Het is bekend, dat de dagelijkse wisselingen van licht en donker een belangrijke factor bij regulatie van gonade-activiteit zijn in het uitwendige milieu. Onder de factoren van het inwendige milieu nemen hormonen een vooraanstaande plaats in en wel speciaal (1) hypothalamische 'releasing factor', (2) hypofysair gonadotropine en (3) door de gonaden geproduceerde steroidhormonen.

(1) Hypothalamische 'releasing factor' vormt de schakel tussen het centrale zenuwstelsel (CZS) en de hypofyse. Via 'releasing factor' oefent het CZS bij uitstek zijn invloed uit op de gonade-activiteit.

(2) Hypofysair gonadotropine is de hormonale factor bij uitstek, waardoor groei, rijping en activiteit van de gonaden wordt werkstelligd. Vanaf de eerste tijd, dat deze factor kon worden geïdentificeerd, is gedacht, dat er twee soorten gonadotropine waren met ieder een apart biologisch werkingsspectrum (Fevold et al., 1933); de hormonen werden aangeduid als luteïniserend hormoon (LH) en follikelstimulerend hormoon (FSH). De discussie over het al dan niet bestaan van twee verschillende soorten gonadotropine is nog steeds niet tot een einde (Schwartz & McCormack, 1972). Aangezien dit onderscheid voor het onderwerp van dit proefschrift niet relevant is, zal over het algemeen slechts van 'gonadotropine' worden gesproken.

(3) De door de gonaden geproduceerde steroidhormonen hebben onder andere een belangrijke functie bij de regulatie van secretie van gonadotropine, onder invloed waarvan zij echter op hun beurt ook weer worden afgescheiden. Dit verschijnsel wordt algemeen aangeduid als de 'feedback-werking' van geslachtshormonen (Moore & Price, 1932).

Gonaden van mannelijke en vrouwelijke dieren ontstaan waarschijnlijk uit een identiek primordium. Hun activiteit in volwassen toestand vertoont echter grote verschillen, zoals:

- de gonaden van vrouwelijke dieren produceren over het algemeen kleine aantallen geslachtscellen tegelijkertijd; de gonaden van mannelijke zoogdieren produceren over het algemeen grote aantallen geslachtscellen tegelijkertijd;
- de gonaden van vrouwelijke zoogdieren kunnen, afhankelijk van hun toestand, kwalitatief overwegend oestrogene hormonen produceren, of progesteron; de gonaden van mannelijke zoogdieren produceren overwegend slechts androgene geslachtshormonen;
- de gonaden van vrouwelijke zoogdieren vertonen cyclische veranderingen: deze cyclische veranderingen worden ofwel overheerst door endogene factoren (zgn. spontane ovuleerders), ofwel door een exogene factor, nl. de copulatiestimulus (zgn. reflectorisch ovulerende dieren); de gonaden van mannelijke zoogdieren vertonen geen soortgelijke cyclische veranderingen.

De twee eerstgenoemde verschillen worden bepaald door verschillen in de gonaden zelf. Met het laatstgenoemde verschil is het echter anders gesteld: transplantatie-experimenten wezen uit, dat de cyclische veranderingen in ovaria in vrouwelijke dieren tenminste bij de zgn. spontaan ovulerende dieren, mede tot stand kwamen door extra-ovariële factoren.

Dergelijke experimenten werden beschreven door Smelser (1933) en Goodman (1934). De experimenten wezen uit, dat cyclische veranderingen in ovariumactiviteit uitbleven als ovaria getransplanteerd werden in gecastreerde mannelijke cavia's resp. ratten. Goodman maakte duidelijk, dat dit uitblijven geen specifiek gevolg was van de transplantatie zelf, aangezien transplantaten in geovariëctomeerde vrouwelijke ratten wél cyclische veranderingen in activiteit vertoonden. Goodman concludeerde, dat mannelijke en vrouwelijke dieren verschillend waren met betrekking tot de factoren van extra-ovariële aard, die verantwoordelijk waren voor cyclische ovariumactiviteit.

De meningen liepen uiteen, wat de aard van deze factor(en) kon zijn. Goodman (1934) veronderstelde, dat de hypofyse van mannelijke ratten niet in staat was een plotseling verhoogde bloedspiegel van 'gonad activating substance' te realiseren. Een dergelijke, plotseling verhoogde afgifte werd in vrouwelijke ratten voor ovulatie verantwoordelijk geacht. Pfeiffer (1936) veronderstelde daarentegen, dat uitblijven van ovulatie in mannelijke ratten berustte op de onmogelijkheid voor de hypofyse om 'luteinizer' in de bloedbaan af te geven. Dit hormoon was door Fevold et al. (1933) als apart soort gonadotropine herkend en verantwoordelijk geacht voor ovulatie en luteinisatie.

De experimenten van Smelser en Goodman boden slechts een beperkte mogelijkheid om inzicht te verkrijgen in de oorzaak van dit verschil tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Smelser (1933) veronderstelde, dat het verschil rechtstreeks samenhang met verschillen in genetische constitutie van mannelijke en vrouwelijke dieren. Goodman (1934) gaf echter een veel vruchtbaarder denkrichting aan met de veronderstelling, dat het verschil berustte op een verschil in ontwikkeling van mannelijke en vrouwelijke dieren en dat inzicht in dit geslachtsverschillende ontwikkelingsproces wellicht verkregen kon worden uit experimenten met op vroege leeftijd gecastreerde mannelijke ratten.

Het door Goodman (1934) beschreven extragonadale geslachtsverschil in regulatie van ovariumactiviteit bood een uitermate interessant studieobject. Het leek mogelijk om met behulp van eenvoudige technieken -nl. morfologisch onderzoek van ovariumweefsel en dagelijkse vagina-uitstrijken ter bepaling van ovariumactiviteit (Long & Evans, 1922)- dieper in te gaan op de ontwikkeling van een geslachtsverschil en zo wellicht dieper inzicht te verkrijgen in de biologische basis van geslacht en geslachtsverschillen. Het was niet nodig om hiervoor ingewikkelde kwalitatieve en kwantitatieve bepalingen van hormonen te doen, wat bij de toenmalige stand van de techniek geen eenvoudige opgave was.

Goodman's idee, dat uitblijven van ovulatie in mannelijke ratten berustte op een ontwikkelingsverschil van mannelijke en vrouwelijke ratten, werd bewaarheid door Pfeiffer (1936). Deze auteur beschreef nl., dat cyclische veranderingen in ovariumactiviteit in gecastreerde mannelijke ratten wél op konden treden, als de castratie van deze dieren maar vlak na de geboorte had plaatsgevonden. Dat cyclische ovarium-activiteit bij deze dieren op kon treden werd geconcludeerd uit

morfologische gegevens: follikelrijping en vorming van *corpora lutea* (CL) traden in ovariumtransplantaten in neonataal gecastreerde mannelijke ratten (NC-♂♂) op gelijke wijze op als in ovaria bij vrouwelijke ratten; daarentegen bevatten ovariumtransplantaten in op volwassen leeftijd gecastreerde mannelijke ratten (AC-♂♂) voortdurend slechts follikels en nooit CL, overeenkomstig Goodman's gegevens.

Pfeiffer (1936) kwam aldus tot de conclusie, dat de afwezigheid van cyclische ovariumactiviteit in AC-♂♂ berustte op een effect van de testes in de neonatale levensfase en dat deze afwezigheid derhalve niet rechtstreeks berustte op een geslachtsverschil in genetische constitutie. In een eerdere publikatie (Pfeiffer, 1935) had hij reeds melding gemaakt van het feit, dat deze conclusie ook geëxtrapoleerd kon worden naar vrouwelijke ratten. Deze dieren vertoonden immers het 'mannelijk patroon' van ovariumactiviteit, gekenmerkt door afwezigheid van cyclische ovulatie en CL-vorming, na neonatale testis-implantatie.

De eerstgenoemde publikatie van Pfeiffer (1936) is het begin geweest van een grote stroom publikaties, waarin getracht is het ontwikkelingsproces van het geslachtsverschil ten aanzien van ovulatie te analyseren. Er lijken diverse oorzaken aanwezig voor het voortduren van onderzoek naar dit ontwikkelingsproces: (1) de schijnbare eenvoud van dit geslachtsverschillende ontwikkelingsproces; (2) de belangrijke functie, nl. ovulatie, ten aanzien waarvan dit geslachtsverschillende ontwikkelingsproces optreedt; (3) de implicaties van wijzigingen in dit ontwikkelingsproces voor andere geslachtsverschillende ontwikkelingsprocessen; (4) wellicht niet in het minst het feit, dat het inzicht ondanks de enorme hoeveelheid werk nog nauwelijks verder gevorderd is dan het ten tijde van Pfeiffer was (Brown-Grant, 1971; Johnson, 1971).

Met betrekking tot (3) kan worden vermeld, dat reeds Pfeiffer (1935) ontdekte, dat de ontwikkeling van het ovulatiemechanisme geen op zichzelf staand proces was. Hij beschreef, dat vrouwelijke ratten na neonatale testisimplantatie op volwassen leeftijd niet alleen een afwijkend ovulatiemechanisme hadden, maar ook geen normaal vrouwelijk bronstgedrag vertoonden.

De resultaten van Pfeiffer bleken overigens een toevalstreffer. Juist bij ratten met hun korte zwangerschapsduur speelt de ontwikke-



ling van geslachtsverschillen zich ten dele nog na de geboorte af en is derhalve met eenvoudige middelen experimenteel te beïnvloeden. Slechts bij enkele andere zoogdiersoorten bleken de bevindingen aan ratten op soortgelijke, eenvoudige wijzen verkrijgbaar: muizen (Barraclough & Leatham, 1954; echter wellicht slechts stamafhankelijk: Peters & Sørensen, 1971) en hamsters (Swanson, 1966).

Bij dieren met een langere zwangerschapsduur spelen de onderhavige ontwikkelingsprocessen zich geheel intra-uterien af en zijn derhalve veel moeilijker te beïnvloeden (cavia: Brown-Grant, 1971). Simpele ingrepen in de neonatale levensfase hebben niet eenzelfde effect als bij ratten (koe, hond en varken: Zimbelman, 1966; rhesusaap: Treloar et al., 1972). Van weer andere zoogdieren, waarbij de vrouwelijke dieren niet spontaan, maar reflectorisch ovuleren na copulatie (konijn, fret, hermelijn, kat en andere) zijn geen experimenten beschreven, die erop duiden dat een soortgelijk geslachtsverschil ten aanzien van het optreden van ovulatie aanwezig is.

Regulatie van gonade-activiteit vertoont meer geslachtsverschillen, welke mede door extragonadale factoren bepaald worden. Onder invloed echter van het vele onderzoek over het ovulatiemechanisme zijn deze op de achtergrond geraakt (Johnson, 1972). Toch was reeds voor de tijd van Goodman en Pfeiffer bekend, dat de hoeveelheid, in hypofyses aanwezig gonadotropine geslachtsverschillend was (Evans & Simpson, 1929) en dat dit verschil niet geheel afhankelijk was van verschillen in de gonaden, aangezien het na gonadectomie bleef bestaan (Hill, 1933). Toen gevoeliger bepalingmethoden voor gonadotropine ter beschikking waren gekomen, kon worden aangetoond, dat niet alleen hypofysegehalten, maar ook bloedspiegels van gonadotropine geslachtsverschillend waren en dat dit verschil niet van uitsluitend verschillen in de gonaden afhankelijk was (Gans, 1959; van Roy & van Rees, 1961).

Clark (1935 a,b) beschreef, dat de hoeveelheid gonadotropine in de hypofyse van prepuberale mannelijke dieren kleiner was dan die in prepuberale vrouwelijke dieren; de situatie was hier dus juist het tegenovergestelde van die bij volwassen dieren (Evans & Simpson, 1929). Het verschil in prepuberale dieren leek echter veroorzaakt te worden door verschillen in de gonaden, aangezien het na gonadectomie verdween.

Omtrent de factoren, die dit tweede geslachtsverschil in gonadotropineproductie en -afgifte bepalen op volwassen leeftijd, valt weinig met zekerheid te zeggen. Experimenten van Johnson (1971; 1972) wijzen uit, dat neonatale testishormonen, dan wel substitutie hiervan door neonatale injectie van testosteron-propionaat (TP), geen invloed hebben op de ontwikkeling van dit geslachtsverschil. Andere factoren dan die, welke het ontwikkelingsproces van het ovulatiemechanisme bepalen, lijken derhalve van beslissende betekenis.

Een derde geslachtsverschil met betrekking tot regulatie van gonade-activiteit van de rat werd vastgesteld door Zeilmaker (1962; 1963a). Deze auteur beschreef geslachtsverschillen ten aanzien van de regulatie van prolactine; dit hormoon is bij de rat het luteotrope hormoon bij uitstek. Regulatie van luteale activiteit in AC-♂♂ bleek in een aantal opzichten verschillend van die in normale vrouwelijke ratten: met name kon geen equivalent van 'pseudozwangerschap' herkend worden. Soortgelijke experimenten als uitgevoerd met AC-♂♂ werden ook uitgevoerd met vrouwelijke ratten, die op de vijfde levensdag een injectie met 1250 µg TP hadden gekregen (Zeilmaker, 1964). Onder invloed van een dergelijke injectie is de aanleg van het ovulatiemechanisme 'vermannelijkt' (Barraclough, 1961). Het bleek dat regulatie van luteale activiteit in dergelijke zgn. TP-♀♀ enerzijds verschilde van die van normale vrouwelijke ratten en anderzijds overeenkomsten vertoonde met die van AC-♂♂. Geconcludeerd werd, dat de ontwikkeling van een 'vrouwelijk' dan wel 'mannelijk' type regulatie van luteale activiteit bepaald werd door de neonatale aanwezigheid van testishormonen of TP. De ontwikkeling van geslachtsverschillen in regulatie van luteale activiteit vertoonde derhalve in dit opzicht een nauwe overeenkomst met de ontwikkeling van geslachtsverschillen in het ovulatiemechanisme.

ASPECTEN VAN DE GESLACHTSVERSCHILLENDE ONTWIKKELING VAN HET OVULATIE-  
MECHANISME BIJ DE RAT

Uit de in het voorgaande beschreven experimenten van Pfeiffer en Goodman werd een concept ontwikkeld ten aanzien van de manier, waarop geslachtsverschillen in het ovulatiemechanisme bij de rat tot stand komen. Dit concept is schematisch weergegeven in figuur 1.

Verondersteld wordt, dat er in de prenatale fase een in mannelijke en vrouwelijke ratten *identieke aanleg* van het ovulatiemechanisme aanwezig is. Deze aanleg kan zich in de neonatale levensfase in één van twee verschillende richtingen ontwikkelen: daarom wordt deze aanleg verondersteld *bipotentiëel* te zijn.

In de vroege neonatale fase wordt onherroepelijk beslist in welke van de twee richtingen de aanleg zich zal ontwikkelen: daarom wordt deze fase als die van *irreversibele differentiatie* aangeduid. Secretieproducten van de neonatale testes sturen de ontwikkeling van de aanleg in *mannelijke* richting; bij afwezigheid van deze secretieproducten ontwikkelt zich de aanleg in *vrouwelijke* richting.

De hoedanigheid van de eindfase in de ontwikkeling van het ovulatiemechanisme manifesteert zich bij aanwezigheid van slechts ovariumweefsel als gonade-weefsel. In het geval van de *vrouwelijke* eindfase treedt *cyclische ovulatie en CL-vorming* op; in geval van de *mannelijke* eindfase wordt *nooit cyclische ovulatie en CL-vorming* waargenomen.

Veel onderzoekers na de jaren 1934-36 hebben getracht de details van dit ontwikkelingsschema te analyseren. Een aantal vorderingen van dit onderzoek zal in het volgende nader worden besproken.

*De aard van de secretieproducten van de neonatale testes, die de ontwikkeling van de aanleg van het ovulatiemechanisme in mannelijke richting bewerkstelligen.*

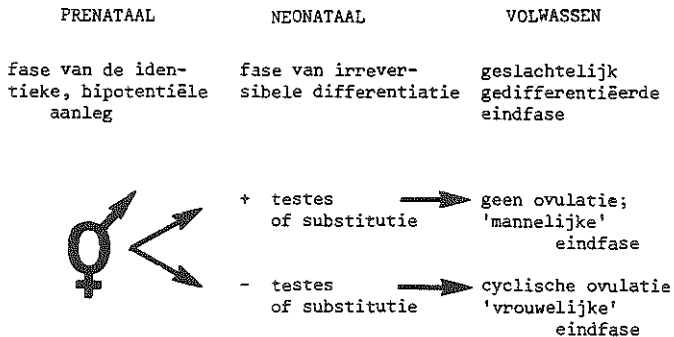
Alhoewel Pfeiffer (1936) duidelijk aantoonde, dat de testes in de neonatale levensfase van de rat de vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme bewerkstelligden, waagde hij zich in zijn publikaties niet aan enige uitspraak over de wijze, waarop de testes

dit effect realiseerden.

In dezelfde tijd, waarin Pfeiffer zijn waarnemingen deed, werd in Amsterdam vastgesteld, dat testes van volwassen stieren een steroidhormoon produceerden, dat in zeer sterke mate 'androgene' effecten had: dit hormoon werd *testosteron* genoemd (David et al., 1935; David, 1935 a,b). Dit hormoon leek kwalitatief én kwantitatief het belangrijkste hormoon, dat door de testes werd geproduceerd. Het hormoon kon reeds spoedig na de ontdekking door chemische synthese op eenvoudige wijze in zuivere vorm verkregen worden (Butenandt & Hanisch, 1935).

Al spoedig bleek, dat neonatale injecties van testosteron -in zuivere vorm ofwel veresterd met propionzuur, waardoor het een langduriger werking verkreeg en in welke vorm het zeer veel wordt toegepast (Astwood, 1966)-eenzelfde effect hadden op de aanleg van het ovulatiemechanisme in vrouwelijke ratten als neonatale testisimplantatie (Pfeiffer, 1935; Bradbury, 1940 en 1941; Wilson et al., 1941).

*Figuur 1 : de ontwikkeling van geslachtsverschillen in het ovulatiemechanisme bij de rat (Pfeiffer, 1936).*



Het bleef voorlopig een technisch onoverkomelijk probleem om aan te tonen, dat neonatale testes inderdaad testosteron produceerden. De beschikbare meetmethoden waren niet gevoelig genoeg om hoeveelheden als door deze testes geproduceerd, ook maar kwalitatief aan te tonen.

In eerste instantie werd het probleem toen op andere wijze benaderd; men trachtte met behulp van histochemische technieken de aanwezigheid van voor steroïdsynthese benodigde enzymen vast te stellen en door onderzoek van aangeboden, radioactief gemerkte 'precursors' de activiteit van deze enzymen te bepalen.

Niemi & Ikonen (1963) toonden aan, dat gedurende de eerste postnatale dagen zeer veel Leydig-cellen in de testes aanwezig waren, die voor steroïdsynthese benodigde enzymen bevatten. Dit aantal nam in de daarop volgende periode snel af om pas vanaf dag 30 geleidelijk aan weer toe te nemen tot de bij volwassen dieren aangetroffen grootte. Zij concludeerden, dat de omstandigheden voor steroïdsynthese in de testes gedurende de eerste levensdagen optimaal waren.

Noumura et al. (1966) namen waar, dat testisweefsel van ratten *in vitro* vanaf de vijftiende zwangerschapsdag progesteron in testosteron en androsteendion om kon zetten. De omzettingssnelheid bereikte een maximale waarde met testisweefsel, dat verkregen was van dieren op de achttiende zwangerschapsdag. De omzettingssnelheid van testisweefsel van de eerste postnatale dag was nog hoog; op latere postnatale dagen was de omzettingssnelheid laag evenals gedurende de rest van de prepuberale periode. Geconcludeerd werd, dat testisweefsel met name in de laatste fase van de zwangerschap en in de eerste postnatale fase androgenen, waaronder testosteron, kón produceren.

Bovengenoemde waarnemingen duiden aan, dat in de late zwangerschapsperiode en in de eerste postnatale dagen de mogelijkheid van secretie van androgenen door de testes aanwezig was. Het feitelijke bewijs van deze secretie werd geleverd door Resko et al. (1968): deze auteurs bepaalden bloedspiegels van androgenen in mannelijke ratten gedurende de gehele postnatale, prepuberale periode. Testosteron was zowel in het bloed als in de testes op de dag van geboorte in relatief hoge concentratie aanwezig. De concentratie nam onmiddellijk na dag 1 af tot lage waarden, die gedurende de gehele prepuberale periode verder werden waargenomen; vanaf de dertigste dag nam de concentratie in bloed en testes geleidelijk toe naar de bij volwassen dieren gevonden waarden.

Er werden gedurende de gehele periode geen meetbare hoeveelheden androsteendion in het bloed gevonden; in de testes was dit androgeen op de dag van geboorte in geringe hoeveelheid aantoonbaar.

Geconcludeerd werd, dat testosteron kwantitatief het belangrijkste androgeen was, dat door neonatale testes werd afgescheiden.

Op grond van bovengenoemde waarnemingen kan het waarschijnlijk geacht worden, dat testosteron het secretieprodukt is van de neonatale testes, dat 'vermannelijking' van de aanleg van het ovulatiemechanisme in mannelijke dieren bewerkstelligt.

Sinds kort is de vraag in de belangstelling gekomen, of testosteron als zodanig de hier bestudeerde vermannelijking bewerkstelligt, of dat een metaboliet van testosteron het eigenlijke agens is.

De reden van deze belangstelling ligt in het feit, dat dihydrotestosteron -dat in een aantal doelwitorganen wellicht de actieve vorm van testosteron is (Bruchovsky & Wilson, 1968)- niet als substitutie van de testes gebruikt bleek te kunnen worden om vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme van vrouwelijke ratten te bewerkstelligen (McDonald, 1971; McDonald & Doughty, 1972). Testosteron daarentegen kon zeer wel als substitutie voor de neonatale testes gebruikt worden (Bradbury, 1941).

Tevens bleek, dat het 'vermannelijkend' effect van neonatale testosteron-injectie in vrouwelijke ratten voorkomen kon worden, indien tevoren een anti-oestrogene stof was geïnjiceerd (injectie met MER-25: McDonald & Doughty, 1972). Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat omzetting van testosteron in een oestrogene metaboliet onderdeel van de 'vermannelijkende' werking van neonataal testosteron kan zijn.

Dit idee lijkt in zoverre aantrekkelijk, dat het een interpretatiekader biedt, waarin de 'vermannelijkende' werking van neonatale oestrogene hormonen kan worden begrepen (oestrogenen uit het ovarium vrijgemaakt onder invloed van gonadotropine-injectie: Bradbury & Gaensbauer, 1939; subcutaan geïnjiceerd oestradiol-benzoaat: Gorski, 1966; intracerebraal geïmplanteerd oestradiol-benzoaat: Sutherland & Gorski, 1972).

*De omvang van de periode van irreversibele differentiatie van de aanleg van het ovulatiemechanisme.*

Uit de onderzoekingen van Goodman (1934) en Pfeiffer (1935; 1936) werd geconcludeerd, dat de aanwezigheid van testisweefsel gedurende de prepuberale periode voldoende was om een definitieve, irreversibele vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme te bewerkstelligen.

Wilson et al. (1941) toonden aan, dat deze vermannelijking eveneens verkregen kon worden door middel van injecties van TP, indien deze injecties (2.5 mg TP per keer) eenmaal per twee dagen gegeven werden vanaf dag 6 tot 35. Tevens werd vastgesteld, dat er geen vermannelijking optrad, als de injecties vanaf dag 15 werden gegeven.

De conclusie was, dat de fase van irreversibele differentiatie op de vijftiende levensdag geëindigd was.

Barracrough (1961) stelde vast, dat een éénmalige injectie van 1.25 mg TP op de vijfde levensdag voldoende was, om de aanleg van het ovulatiemechanisme van vrouwelijke ratten te 'vermannelijken'. Een dergelijke injectie was sterk verminderd of in het geheel niet effectief na de tiende levensdag. Een éénmalige injectie van 1 mg TP in NC-♂♂ -castratie op dag 1- voor de tiende levensdag, had een 'vermannelijkend' effect op de aanleg van het ovulatiemechanisme in deze dieren (Adams Smith & Peng, 1967; Ladosky et al., 1969).

De conclusie was, dat de fase van irreversibele differentiatie van de aanleg van het ovulatiemechanisme in mannelijke en in vrouwelijke dieren omstreeks de tiende levensdag eindigde.

Om te onderzoeken, wanneer de differentiatiefase een aanvang nam, werd het effect bestudeerd van prenatale injecties van TP. In experimenten waarin aan zwangere ratten een grote hoeveelheid TP werd toegediend, bleek de aanleg van het ovulatiemechanisme in het vrouwelijk nakomelingschap niet te zijn vermannelijkt (Swanson & Van der Werff ten Bosch, 1964b; Kincl & Maqueo, 1965); het ingespoten TP had over het algemeen wél een duidelijk vermannelijkend effect op de externe genitalia van deze dieren. In experimenten, waarin TP rechtstreeks in de foetussen werd ingespoten, bleek de aanleg van het ovulatiemechanisme van vrouwelijke nakomelingen wél te zijn vermannelijkt (Swanson & Van der Werff ten Bosch, 1965). Door de vermoedelijk lange werkingsduur van TP is het echter moeilijk vast te stellen op welk tijdstip na de injectie het effect op het ovulatiemechanisme werd gerealiseerd (Gorski, 1968).

Injectie van TP op de dag van geboorte bleek zeer effectief in vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme (Swanson & Van der Werff ten Bosch, 1964b).

Uit deze waarnemingen werd geconcludeerd, dat de fase van irreversibele differentiatie omstreeks het tijdstip van geboorte een

aanvang neemt.

Beide bovengenoemde conclusies tesamen doen derhalve veronderstellen, dat de omvang van de neonatale fase van irreversibele differentiatie ongeveer 10 dagen lang is.

*De minimale werkingsduur van de secretieprodukten van de neonatale testes, nodig om vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme te bewerkstelligen.*

Aangezien een éénmalige injectie van TP op dag 5 reeds voldoende is om de aanleg van het ovulatiemechanisme van vrouwelijke ratten en NC-♂♂ te vermannelijken (Barraclough, 1961; Ladosky et al., 1969), is duidelijk, dat vermannelijking van deze aanleg optreedt ook indien blootstelling aan neonatale testishormonen of TP slechts gedurende een gedeelte van de differentiatiefase optreedt.

Op de twee volgende manieren heeft men getracht inzicht te verkrijgen in de minimale werkingsduur van testishormonen of TP, nodig om vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme te bewerkstelligen.

1. Onderzoek naar de relatie tussen het tijdstip van castratie van neonatale mannelijke ratten en het optreden van CL-vorming in later ingebrachte ovariumtransplantaten.

Een drietal onderzoekers heeft gedetailleerde gegevens beschreven omtrent het optreden van CL-vorming in ovariumtransplantaten in mannelijke ratten, die op verschillende tijdstippen na de geboorte waren gecastreerd. Hun gegevens zijn verzameld in tabel 1.

Uit deze gegevens blijkt, dat CL-vorming kan worden waargenomen als castratie binnen 4 dagen na de geboorte heeft plaatsgevonden. Opvallend echter is hierbij het grote verschil tussen de resultaten, beschreven door Harris (geen CL-vorming na castratie op dag 3) en die beschreven door de beide andere auteurs (wél CL-vorming na castratie op dag 3).

Het is echter moeilijk een betrouwbare uitspraak te doen omtrent de betekenis van deze verschillen. Daar is bijv. het feit dat Yazaki geen proefdieren van ingeteelde stammen gebruikte, waardoor afstotingsreacties van subcutane ovariumtransplantaten tot de mogelijke oorzaken



van zijn relatief povere resultaten gerekend kunnen worden. Harris daarentegen gebruikte weliswaar ook ratten van niet-ingeteelde stammen, maar plaatste de transplantaten intra-oculair; het oog is voor dergelijke transplantatie-experimenten een bevoorrechte plaats door het relatief ontbreken van afstotingsreacties (Parkes & Deanesley, 1966).

Tabel 1 : Relatie tussen de dag van castratie (dag van geboorte = dag 1) en CL-vorming in later ingebrachte ovariumtransplantaten bij mannelijke ratten (litteratuurgegevens)

dag van castratie	Yazaki (1960)	Harris (1964)b	Gorski (1966)
1	4 / 20 <sup>a</sup>	32 / 35	--
2	--	4 / 15	--
3	9 / 30	] 0 / 47	8 / 9
4	] 0 / 50		--
5		1 / 6	
6 - 10		--	0 / 9

<sup>a</sup> aantal dieren met CL / aantal onderzochte dieren

Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd, dat vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme in mannelijke ratten plaatsvindt onder invloed van de secretie van testishormonen gedurende de eerste drie dagen. De eerder besproken gegevens van Resko et al. (1968) wezen uit, dat de secretorische activiteit van de testes op de eerste levensdag verreweg het hoogst was. Het ligt dan ook voor de hand te veronderstellen, dat de vermannelijking zich grotendeels reeds op de eerste levensdag voltrekt. Aldus bezien is de door Harris (1963, 1964 a,b) geopperde veronderstelling, dat blootstelling van de aanleg van het ovulatiemechanisme aan de werking van testishormonen gedurende

24 uur voldoende is om deze te 'vermannelijken', een gerechtvaardigde benadering.

2. Onderzoek naar de werkingsduur van exogeen geïnjecteerd testosteron, nodig om vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme te bewerkstelligen.

Alhoewel het moeilijk is om een goede uitspraak te doen omtrent de werkingsduur van een éénmalige injectie van TP, zijn er aanwijzingen dat de werkingsduur van een éénmalige injectie van 1.5 mg tot 15 dagen kan zijn (Jacobsohn & Norgren, 1965). Het lijkt daarom niet zinvol bij het onderzoek naar de minimaal benodigde werkingsduur experimenten te betrekken waarin een hoeveelheid van 1.25 mg TP werd ingespoten (tallose studies sinds Barraclough, 1961).

Arai & Gorski (1968 b) beschreven, dat vermannelijking verkregen kon worden door een éénmalige injectie van 30 µg TP op de vijfde levensdag. Bij gelijktijdige toediening van een anestetische dosis barbituraat werd dit effect van 30 µg TP verhinderd. Uit het feit, dat het effect van TP weer wél kon worden waargenomen, indien de dosis barbituraat 12 uur na TP werd gegeven, concludeerden zij, dat de minimaal benodigde werkingsduur van TP ongeveer 12 uur moest zijn.

In latere experimenten bleek verhinderen van het effect van 30 µg TP op het ovulatiemechanisme met barbituraat niet op dezelfde, eenvoudige wijze herhaalbaar (Sutherland & Gorski, 1972). De conclusie uit het bovengenoemde experiment kan dan ook slechts met reserve gehanteerd worden.

De minimaal benodigde werkingsduur werd nog op andere wijze bestudeerd. Het bleek dat cyproteron-acetaat -een stof die de werking van testosteron in diverse eindorganen verhindert (Neumann et al., 1970a)- in staat was de vermannelijkende werking van een éénmalige injectie van 30 µg TP te verhinderen, mits deze stof binnen 6 uur na TP werd toegediend (Arai & Gorski, 1968 a). De auteurs concludeerden opnieuw, dat de minimaal benodigde werkingsduur van neonataal testosteron slechts enkele uren bedroeg.

Deze laatste conclusie werd aangevochten door Alklint & Norgren (1971). Deze auteurs namen waar, dat twee, gelijktijdig toegediende injecties van 1.5 mg onveresterd testosteron op de vijfde levensdag slechts bij een gedeelte van de dieren vermannelijking van de aanleg

van het ovulatiemechanisme tot gevolg had. Dit stemde overeen met eerdere waarnemingen dienaangaande van Kincl et al. (1965). Alhoewel gegevens aangaande de werkingsduur van een dergelijke hoeveelheid testosteron ontbreken, leek het de auteurs onwaarschijnlijk dat deze slechts enkele uren bedroeg.

De conclusie uit bovengenoemde twee benaderingen lijkt te zijn, dat de minimale werkingsduur van neonatale testishormonen tenminste 6 en vermoedelijk niet meer dan 24 uur bedraagt.

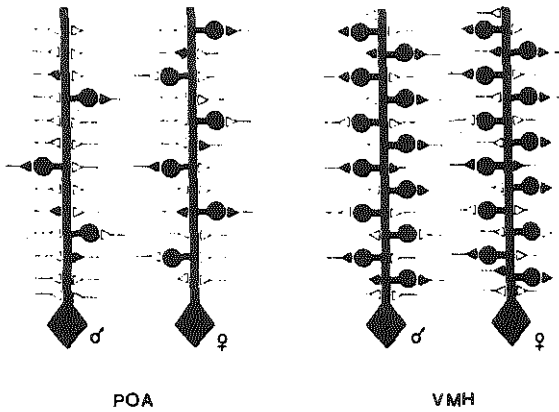
*Het substraat, waar de vermannelijkende werking van testishormonen op de aanleg van het ovulatiemechanisme wordt geëffectueerd.*

Denkend in termen van de door Moore & Price (1932) voorgestelde interrelatie tussen hypofyse en ovarium ter verklaring van adequate regulatie van ovariumactiviteit, lag het voor Pfeiffer (1936) voor de hand te veronderstellen, dat de hypofyse het substraat vormde, waar neonatale testishormonen de vermannelijking van de aanleg van het ovulatiemechanisme effectueerden. Naar zijn mening bestond de vermannelijking hierin dat de hypofyse niet meer in staat was één van twee door Fevold et al. (1933) onderscheiden gonadotrope hormonen, te weten 'luteinizer', in de bloedbaan af te geven.

Deze mening bleef gehandhaafd totdat het onder invloed van allerlei werk bleek (Harris, 1948), dat de hypofyse in zijn functioneren in hoge mate afhankelijk was van het CZS: het CZS kon geacht worden om, via het portaalvatensysteem tussen de *eminetia mediana* en hypofysevoorkwab, het functioneren van deze laatste in belangrijke mate te beheersen.

Dat inderdaad niet de hypofyse zelf, maar veeleer de besturing van de hypofyse door het CZS het substraat van de vermannelijkende werking van neonatale testishormonen vormde, werd vervolgens aangetoond door middel van hypofyseverwisseling (Harris & Jacobsohn, 1952; Segal & Johnson, 1959). Het bleek, dat cyclische ovariumactiviteit in vrouwelijke ratten na hypofysectomie opnieuw kon optreden, als op de plaats van de oorspronkelijke hypofyse de hypofyse van een mannelijke rat, resp. neonataal met TP behandelde vrouwelijke rat, werd gezet.

Uit latere experimenten bleek, dat stimulatie van het CZS, die in normale vrouwelijke ratten onder adequate experimentele omstandig-



*Figuur 2 : Schematische weergave van dendrieten in de area pre-optica (POA) en nucleus ventromedialis (VMH) van mannelijke en vrouwelijke ratten*

*( uit: Raisman & Field, 1972)*

Op de dendrieten zijn uitsteeksels aanwezig (zwarte bolletjes). Synaptische contacten met axon-eindigingen van amygdaloïde (zwarte driehoekjes) en niet-amygdaloïde (witte driehoekjes) oorsprong zijn aanwezig op de schachten en op de uitsteeksels van de dendrieten.

Opvallend is:

1. Het aantal uitsteeksels per dendriet is groter in VMH dan in POA; dit gaat voor zowel mannelijke als vrouwelijke dieren op.
2. In POA hebben vrouwelijke dieren ongeveer tweemaal zoveel dendrietuitsteeksels als mannelijke dieren.
3. Bij mannelijke zowel als vrouwelijke dieren is een aanzienlijk deel van de axon-eindigingen, die synaptisch contact maken op dendrietuitsteeksels, van amygdaloïde oorsprong.
4. In VMH komen weinig synaptische contacten van amygdaloïde oorsprong voor op dendrietschachten; in POA komt ongeveer de helft van deze contacten tot stand op de dendrietschachten.

heden tot ovulatie aanleiding kon geven, eenzelfde effect teweeg kon brengen in TP- $\frac{00}{++}$ . Deze laatste dieren dienden dan echter tevoren met progesteron te worden ingespoten; deze injectie werd noodzakelijk geacht om de aanwezigheid van een voor ovulatie voldoende hoeveelheid gonadotropine in de hypofyse tot stand te brengen (Barraclough, 1961).

Deze experimenten wezen uit, dat de voor ovulatie benodigde overdracht van informatie uit het CZS naar de hypofyse in TP- $\frac{00}{++}$  door kunstmatige stimulatie wel tot stand kon worden gebracht, maar onder 'natuurlijke' omstandigheden nooit voorkwam.

Uit verder onderzoek werd geconcludeerd, dat de oorzaak van dit onder natuurlijke omstandigheden achterwege blijven van ovulatie in TP- $\frac{00}{++}$  gelegen was in effecten van neonataal TP op neuronen in de zgn. *area preoptica* in het CZS (Barraclough, 1966, 1967; Gorski, 1966). Een belangrijke basis voor deze veronderstelling was gelegen in het feit, dat neonataal toegediend TP vooral een verhogend effect had op de drempelwaarde van inductie van ovulatie door kunstmatige stimulatie van de *area preoptica*; drempelwaarden verder in de richting van de hypofysesteel (i.c. in de mediobasale hypothalamus) leken onder invloed van neonataal TP nauwelijks veranderd.

In latere onderzoeken echter, waarin naast elektrische ook zgn. 'elektro-chemische' stimulatie (Everett & Radford, 1961) werd toegepast, bleek deze selectieve drempelwaarde-verhogende werking van neonataal geïnjecteerd TP niet herhaalbaar (Quinn, 1966: inductie van ovulatie in ovariumtransplantaten in op volwassen leeftijd gecastreerde mannelijke ratten door elektrochemische stimulatie van de *area preoptica*; Terasawa et al., 1969 en Everett et al., 1970: bij TP- $\frac{00}{++}$ ). Er werd dan ook verondersteld (Moll & Zeilmaker, 1966; Quinn, 1966; Everett, 1969), dat niet zozeer intrinsieke eigenschappen van de *area preoptica* onder invloed van neonatale testishormonen werden veranderd, maar dat veeleer de afferente structuren van de *area preoptica* het substraat van de werking van neonatale testishormonen vormden.

Dat wellicht de afferente structuren van de *area preoptica* geslachtsverschillend georganiseerd waren, heeft onlangs een morfologische ondersteuning gekregen. Elektronenmicroscopisch onderzoek wees uit dat axoneindigingen in de *area preoptica* bij mannelijke dieren op andere wijze contact maakten met dendrieten van neuronen van de *area preoptica* dan bij vrouwelijke dieren (fig. 2: Raisman & Field, 1971;

1972). Een dergelijk verschil deed zich niet voor in de *nucleus ventromedialis*. Een publikatie is in voorbereiding, waarin wordt aangetoond, dat TP-♂♂ een *area preoptica* vertonen als mannelijke dieren en NC-♂♂ een als vrouwelijke dieren (Raisman, pers. meded.).

Er zijn nog meer experimentele gegevens, die het idee ondersteunen, dat de afferente structuren naar de *area preoptica* geslachtsverschillende eigenschappen hebben. Arai (1971) beschreef, dat elektrochemische stimulatie van de mediale *amygdala* bij vrouwelijke ratten gevolgd kon worden door ovulatie. Dezelfde stimulus bleek echter niet effectief in TP-♂♂ of AC-♂♂. De *amygdala* staan via de *striae terminales* in nauw contact met o.a. de *area preoptica* (Cowan et al., 1965; Heimer & Nauta, 1969). In andere experimenten was aannemelijk gemaakt, dat het ovulatie-inducerend effect van stimulatie van de *amygdala* via de *striae terminales* tot stand kwam (Velasco & Taleisnik, 1969).

Het lijkt echter niet waarschijnlijk, dat de vermannelijken- de werking van neonatale testishormonen op de aanleg van het ovulatiemechanisme uitsluitend bestaat uit een werking op de afferente structuren van de *area preoptica*. De *area preoptica* zelf immers, in samenhang met de hypothalamus maar gescheiden van de rostraal en dorsaal binnenkomende afferentie, is nog in staat om de afgifte van een ovulatoire hoeveelheid gonadotropine uit de hypofyse tot stand te brengen (Köves & Halasz, 1970; Kaasjager, 1970). Het lijkt onwaarschijnlijk, dat dezelfde ingreep in het CZS van TP-♂♂ -welke dieren nooit spontaan ovuleren- gevolgd zou worden door spontane ovulaties. Het ligt dan ook voor de hand te veronderstellen, dat ook binnen een aldus gemaakt 'preoptisch-hypothalamisch eiland' geslachtsverschillen, die verband houden met de inductie van ovulatie, aanwezig zijn. De conclusie dringt zich dan ook op, dat het preoptisch-hypothalamische complex, en in het bijzonder het preoptische deel daarvan (Halasz & Pupp, 1965; Köves & Halasz, 1970; Barraclough, 1966, 1967; Gorski, 1966; Kaasjager, 1970) eveneens substraat van de werking van neonatale testishormonen op het ovulatiemechanisme vormt.

*Beschrijving van het geslachtsverschil met betrekking tot het optreden van ovulatie in eenvoudiger meetbare grootheden zoals produktie en/of secretie van gonadotropine na behandeling met geslachtshormonen.*

Aan de in voorgaande experimenten gehanteerde methoden kleeft een aantal bezwaren:

1. Bij gebruik van ovulatie en/of CL-vorming in ovaria of ovariumtransplantaten als criterium voor een 'mannelijk' of 'vrouwelijk' type ovulatiemechanisme, kunnen effecten van neonatale ingrepen pas op veel latere leeftijd bestudeerd worden. Aangetoond is, dat effecten van neonataal toegediend TP reeds in de prepuberale periode waarneembaar zijn (Uilenbroek & Van der Werff ten Bosch, 1972).
2. Ovulatie en/of CL-vorming is geen eenduidig criterium voor het vaststellen van een 'vrouwelijk' of 'mannelijk' type van de eindfase van de ontwikkeling van het ovulatiemechanisme: resultaten van onderzoek van dit criterium bij vrouwelijke ratten op verschillende postpuberale leeftijden konden uiteenlopen (Swanson & Van der Werff ten Bosch, 1964a).
3. Het interpretatiekader van waarnemingen aan ovulatie is gering en zal met name niet tot buiten de ovariumfysiologie reiken. Het is derhalve niet goed mogelijk de implicaties van wijzigingen in de neonatale fase in de ontwikkeling van de aanleg van het ovulatiemechanisme te begrijpen in het milieu waarin de 'vermannelijking' onder normale omstandigheden plaatsvindt, i.c. in mannelijke dieren. Eenvoudige transplantatie-experimenten, als met ovaria mogelijk zijn, zijn bij de huidige stand van techniek met testes niet mogelijk (Lee et al., 1971; Gittes et al., 1972; Altwein et al., 1972).

Aan een aantal van deze bezwaren kan mogelijk tegemoet getreden worden, indien de effecten van neonatale ingrepen in de ontwikkeling van het ovulatiemechanisme uitgedrukt kunnen worden in grootheden, waarvan de betekenis voor andere situaties van regulatie van gonade-activiteit wellicht eenvoudiger begripbaar is. Met name is getracht effecten van injectie van geslachtshormonen op secretie van gonadotropine in gegonadectomeerde mannelijke en vrouwelijke dieren te analyseren.

Deze benadering werd geïntroduceerd door Taleisnik en diens medewerkers. Zij beschreven (Caligaris et al., 1966; Taleisnik et al., 1969), dat in geovariëctomeerde vrouwelijke ratten na progesteron-injectie verhoogde secretie van gonadotropine kon worden waargenomen, als de dieren 3 dagen tevoren met oestradiol-benzoaat of TP waren ingespoten. De verhoogde secretie van gonadotropine werd verkregen in de vroege

namiddag, ongeacht het tijdstip, waarop de injectie van progesteron had plaatsgevonden. De verhoogde afgifte van gonadotropine vertoonde op deze wijze wat betreft patroon en tijdstip een nauwe overeenkomst met de mede onder invloed van geslachtshormonen optredende ovulatoire afgifte van gonadotropine op pro-oestrus.

Er werd geen verhoogde afgifte van gonadotropine waargenomen bij AC-♂♂ na voorbehandeling met oestradiolbenzoaat en progesteron. Het leek er aldus op, dat de verhoogde secretie van gonadotropine in verband stond met de aanwezigheid van een 'vrouwelijk' type ovulatiemechanisme. NC-♂♂ echter vertoonden eveneens géén verhoogde afgifte van gonadotropine; uit eerder genoemde experimenten was daarentegen duidelijk geworden, dat dergelijke dieren wél een 'vrouwelijk' type ovulatiemechanisme bezaten. In latere experimenten van dezelfde auteurs (Taleisnik et al., 1971) werd echter beschreven, dat bij herhaling van bovengenoemde experimenten, en met gebruikmaking van gevoeliger meetmethoden voor gonadotropine, NC-♂♂ wél verhoogde secretie van gonadotropine vertoonden, zij het in mindere mate dan vrouwelijke dieren.

Eenzelfde benadering werd toegepast door Neill (1972) op de secretie van prolactine. De auteur beschreef 'prolactin-surges' in geovariëctomeerde vrouwelijke ratten na behandeling met oestradiolbenzoaat. Deze 'surges' konden niet verkregen worden op gelijke wijze bij AC-♂♂ of TP-♀♀; daarentegen traden wél 'surges' op bij 50% van de onderzochte NC-♂♂.

De experimenten tonen aan, dat het mogelijk is om geslachtsverschillen te bepalen in secretie van gonadotropine na voorbehandeling met geslachtshormonen. De bovengenoemde resultaten kunnen in nauw verband gebracht worden met aan- of afwezigheid van spontane ovulatie in ovariumweefsel. De eenduidigheid van de verkregen gegevens laat echter nog te wensen over.



## HOOFDSTUK 2 : MOTIVERING VAN HET EIGEN ONDERZOEK

Uit het voorgaande moge duidelijk zijn, dat reeds veel onderzoekers de geslachtsdifferentiatie van het ovulatiemechanisme hebben bestudeerd. Het totale resultaat van hun inspanningen is een grote hoeveelheid informatie aangaande dit differentiatieproces, zonder dat dit echter in de kern - in het CZS - wordt getroffen. Wellicht het enige werk, dat de kern rechtstreeks benadert, is het eerder genoemde werk van Raisman & Field (1971, 1972). De volgende uitspraak van Brown-Grant in een recent artikel geeft de relativiteit van het tot nog toe bereikte inzicht kernachtig weer: '...In what way, other than by the purely operational definition that, if we transplant an ovary, cyclic ovulation ensues can we distinguish between the brains of a female rat or a male rat castrated at birth and those of an intact male or a female treated with androgenic hormone during the neonatal period? This question should serve to restore a sense of proportion about what has been accomplished so far by any of us' (Brown-Grant, 1971).

Nauwkeurige bestudering van de beschikbare literatuur wijst zelfs uit, dat de bovengenoemde 'cyclic ovulation of .... a male rat castrated at birth' slechts oppervlakkig is vastgesteld, nl. over het algemeen aan de hand van de aanwezigheid van CL in ovariumtransplantaten bij autopsie (Adams Smith & Peng, 1967; Gorski, 1966 e.a.), met daarbij soms gegevens van uitstrijken of morfologie van vagina-epitheel (Yazaki, 1960; Harris, 1964; Kawashima, 1964; Flerko et al., 1967; Neumann et al., 1970a). In geen dezer publikaties wordt regelmatige 4 en/of 5-daags cyclische ovariumactiviteit - zoals algemeen bij vrouwelijke ratten voorkomt - bij NC-♂♂ met ovariumtransplantaten beschreven.

Het is in de laatste jaren duidelijk geworden, dat onderhouden van cyclische ovulatie van de functie van meer factoren in het CZS afhankelijk is dan het optreden van ovulatie alleen: na doorsnijding van de rostrale en dorsale afferentie van het preoptisch-hypothalamische complex wordt geen regelmatige cycliciteit meer waargenomen, terwijl daarentegen ovulatie nog wel op kan treden (Köves & Halasz, 1970; Kaasjager, 1970; Butler & Donovan, 1971; Wildschut, 1972).

Het lijkt de moeite waard te onderzoeken, of het door Pfeiffer (1936) opgestelde concept van de geslachtsdifferentiatie slechts geldt ten aanzien van het optreden van ovulatie alleen, dan wel of het concept toegepast kan worden op het gehele regulatiemechanisme van regelmatige, cyclische ovariumactiviteit.

Daartoe zal in HOOFDSTUK 4 worden onderzocht, of ovariumtransplantaten in NC-♂♂ regelmatige 4/5-daags cyclische veranderingen ondergaan; daarbij zal ook worden nagegaan, of de afgifte van de voor ovulatie benodigde hoeveelheid gonadotropine omstreeks hetzelfde tijdstip op de dag van pro-oestrus geschiedt als bij normale vrouwelijke ratten (Everett, Sawyer & Markee, 1949).

Aangezien waarnemingen aan getransplanteerd vaginaweefsel een belangrijke informatiebron bij de experimenten vormen, zal allereerst de validiteit van dergelijke gegevens worden onderzocht. Daartoe zal de morfologie van getransplanteerd vagina-weefsel in cyclische vrouwelijke ratten en AC-♂♂ met een ovariumtransplantaat worden bestudeerd (HOOFDSTUK 3).

De in de algemene inleiding genoemde experimenten van Zeilmaker (1962; 1963; 1964) maakten aannemelijk, dat de neonatale levensfase van ratten ook een fase van irreversibele differentiatie was in de ontwikkeling van regulatiemechanismen van luteale activiteit. Uit diverse experimenten is bekend, dat het ovulatiemechanisme enerzijds, en regulatiemechanismen van luteale activiteit anderzijds, in nauwe relatie tot elkaar staan, alhoewel ze op hypothalamisch niveau ook gescheiden kunnen worden ( Zeilmaker, 1965; Everett & Quinn, 1966; Arai, 1969; Carrer & Taleisnik, 1970 ).

In HOOFDSTUK 5 en 6 zal worden nagegaan, of het op grond van de experimenten van Zeilmaker opgestelde concept van de geslachtsdifferentiatie van regulatie van luteale activiteit gevalideerd kan worden. Tevens zal worden onderzocht, hoe de mogelijke relatie is tussen de geslachtsdifferentiatie van het ovulatiemechanisme en die van regulatiemechanismen van luteale activiteit.

Daartoe zullen kenmerken van regulatie van luteale activiteit bij NC-♂♂, AC-♂♂ en TP-♀♀ met elkaar vergeleken worden.

Tenslotte zal in HOOFDSTUK 7 een aspect van de uitkomsten van hoofdstuk 3 nader worden uitgewerkt, nl. dat cyclische ovulatie in NC-♂♂ reeds kort na ovariumimplantatie ophoudt. Dit verschijnsel was eerder beschreven door Yazaki (1960) en Harris (1964).

Er zal worden nagegaan, welke factoren op het ophouden van cyclische ovariumactiviteit een belangrijke invloed hebben.

Daartoe zal cyclische ovariumactiviteit in NC- $\delta\delta$  onderzocht worden onder diverse experimentele omstandigheden.

### HOOFDSTUK 3 : GETRANSPLANTEERD VAGINAWEEFSEL ALS INDICATOR VAN OVARIUMACTIVITEIT

#### INLEIDING

Gedurende de eerste decennia van deze eeuw werd ontdekt dat de oestrus-cyclus van dieren als *cavia* (Stockard & Papanicolacu, 1917), muis (Allen, 1922) en rat (Long & Evans, 1922) op eenvoudige wijze kon worden gevolgd aan de hand van het microscopisch aspect van uitstrijken van de vagina. De samenstelling van de populatie van cellen, die door het uitstrijken van het epitheliale oppervlak van de vagina werd verwijderd, veranderde gedurende de cyclus op karakteristieke wijze.

Het bleek, dat met name de oestrus-cyclus van de rat van korte duur was en een strakke regelmaat vertoonde (Long & Evans, 1922). Het werd aldus mogelijk om op basis van vagina-uitstrijken betrouwbare uitspraken te doen omtrent de toestand en de te verwachten ontwikkelingen in activiteit van het ovarium; derhalve kon het effect van allerlei experimentele ingrepen op verwachte ontwikkelingen nauwkeurig worden vastgesteld. Het is wellicht voornamelijk op basis van deze simpele techniek dat een groot aantal onderzoekers een gedetailleerd inzicht in de regulatiemechanismen van de oestrus-cyclus van de rat heeft weten op te bouwen; de 'timing' van diverse factoren voorafgaande aan de ovulatie is hiervan een fraai voorbeeld (Everett & Sawyer, 1949; Everett, 1961). Ook nu nog is het maken van dagelijkse vagina-uitstrijken een zeer belangrijke techniek bij het ovarium-fysiologisch onderzoek.

De cytologie van vagina-uitstrijken ondergaat een aantal abrupte veranderingen gedurende de cyclus. Op basis van verschillen in microscopisch aspect van vagina-uitstrijken maakten Long & Evans (1922) onderscheid tussen 5 cyclusstadia, die in duur varieerden van 6 tot 57 uur. Het is echter een algemeen gebruikelijke laboratorium-routine geworden om cyclus-dagen in plaats van -stadia te onderscheiden. Door de hoge mate van voorspelbaarheid (80% en meer: Schuiling, 1972; persoonlijke waarneming) van komende ontwikkelingen is het dagelijks

op ongeveer hetzelfde tijdstip maken van uitstrijken voldoende om de cyclus nauwkeurig te vervolgen. Er bestaan tussen de laboratoria geringe verschillen omtrent de benoeming van de aldus verkregen cyclusdagen. Wij zullen ons houden aan de in tabel 2 weergegeven terminologie.

De veranderingen in de cytologie van dagelijkse vagina-uitstrijken gedurende de 5-daagse cyclus worden waarschijnlijk vooral bepaald door veranderingen in bloedspiegels van oestrogene ovariumhormonen. De aanwezigheid van deze hormonen manifesteert zich in proliferatie en cornificatie van het vagina-epitheel en het verschijnen van voornamelijk kernhoudende epitheelcellen op de pro-oestrusdag en verhoorde cellen op de oestrusdag. Afwezigheid van oestrogene hormonen is wellicht de belangrijkste oorzaak van de epitheelafbraak en de aanwezigheid van leukocyten gedurende de dioestrusdagen (Barker & Walker, 1966). Er worden slechts geringe hoeveelheden progesteron geproduceerd door niet-functionele CL gedurende de korte cyclus (Uchida et al., 1969); als progesteron in grote hoeveelheden en gedurende langere tijd wordt geproduceerd, dan worden vagina-epitheel en -uitstrijk mucus (Barker & Walker, 1966)

Alhoewel de relatie tussen de cytologie van het vagina-epitheel en ovariumactiviteit onder normale omstandigheden vrijwel altijd het door Long & Evans (1922) beschreven beeld vertoont, kunnen onder experimentele omstandigheden veranderingen in deze relatie optreden.

In diverse publikaties werd vermeld, dat ovulatie en CL-vorming niet gepaard gingen met het verschijnen van leukocyten in het vagina-epitheel of in uitstrijken (Yazaki, 1959, en Zeilmaker, 1962: geen leukocytenpenetratie in getransplanteerd vaginaweefsel na inductie van CL-vorming in ovariumtransplantaten in AC-♂♂; Barraclough & Fajer, 1968: geen leukocytaire uitstrijken na inductie van ovulatie en CL-vorming in TP-♀♀; Ladosky et al., 1969: constante vaginale verhooring bij cyclische ovariumactiviteit in neonataal geovariëctomeerde vrouwelijke ratten met ovariumtransplantaten). In andere experimenten werd waargenomen, dat leukocytaire uitstrijken niet altijd samengingen met het optreden van ovulatie en/of vorming van CL (Pfeiffer, 1934: cyclische vaginale veranderingen zonder cyclische CL-vorming na implantatie van ovaria van neonatale ratten in geovariëctomeerde volwassen vrouwelijke ratten; Everett, (1939),

Tabel 2 : Enkele veelvuldig gehanteerde begrippen aangaande de ovariumcyclus van de rat

Dag van de cyclus nummer	de cyclus benaming	karakteristiek kenmerk in het ovarium	karakteristiek kenmerk van vagina-epitheel		
			<i>in situ</i> (uitstrijk)	transplantaat (uitstrijk)	transplantaat* (morfologie)
0	oestrus	postovulatoire, hemorrhagische follikels; oöcyten in de tuba	gecornificeerde cellen	gecornificeerde cellen	gecornificeerde cellen
1	dioestrus-1	basofiele Cl, meestal met centrale holte	zeer veel intacte leukocyten en blazige, kernhou- dende epitheel- cellen	zeer veel intacte leukocyten en blazige, kernhou- dende epitheel- cellen	kernhoudende, dikwijls blazige epitheelcellen
2	dioestrus-2	grote basofiele tot eosinofiele CL	vervloeide leuko- cyten; wisselende hoeveelheid epi- theelcellen	zeer veel intacte, maar ook ver- vloeide leuko's; blazige, kernhou- dende epitheel- cellen	kernhoudende, dikwijls blazige epitheelcellen
3	dioestrus-3	begin van luteolyse in eosinofiele CL	vervloeide leuko's, weinig epitheel- cellen; soms mucus	kernhoudende epitheelcellen	gecornificeerde cellen op proli- fererend epitheel
4	pro-oestrus	vettige degeneratie van grote, eosino- fiele CL	kernhoudende epitheelcellen	gecornificeerde cellen	gecornificeerde cellen op sterk ontwikkeld epitheel

\* microscopische morfologie van het epitheliale oppervlak van onder het nierkapsel getransplanteerd vaginaweefsel

Bradbury ( 1941), en Mandl, (1961): leukocytaire uitstrijken in anovulatoire ratten; Stern et al., 1965: leukocytaire uitstrijken na farmacologische behandeling van TP-♀♀ ; Malven & Francis, 1959: een tweede vaginale cyclus na eenmalige inductie van ovulatie in TP-♀♀ ; Brown-Grant & Raisman, 1972: leukocytaire uitstrijken na allerlei operatieve ingrepen). Bij muizen tenslotte werd beschreven, dat neonatale behandeling met oestrogene hormonen het vagina-epitheel ongevoelig maakte voor veranderingen in bloedspiegels van geslachtshormonen (Takasugi, 1954; Gardner, 1959; Takasugi et al., 1962).

Veranderingen in het epitheel en in uitstrijken van getransplanteerd vagina-weefsel zijn door diverse auteurs gebruikt als indicator van ovariumactiviteit in mannelijke dieren (Yazaki, 1959 en 1960; Zeilmaker, 1963; Harris, 1964; Kawashima, 1964; Flerko et al., 1967).

In experimenten met AC-♂♂ met ovariumtransplantaten (Yazaki, 1959; Zeilmaker, 1963) bleek het getransplanteerde vagina-epitheel voortdurend gecornificeerd. Dit stemde overeen met de waarnemingen, dat in ovariumtransplantaten in dergelijke dieren voortdurend slechts follikelrijping en nooit ovulatie of CL-vorming optrad (Goodman, 1934).

In experimenten met NC-♂♂ met ovariumtransplantaten vertoonde het epitheel van vaginatransplantaten naast perioden met cornificatie ook perioden met leukocyten-penetratie (Yazaki, 1960; Harris, 1964; Kawashima, 1964; Flerko et al., 1967). Cycli van vergelijkbare regelmaat als bij ♀♀ werden echter niet waargenomen.

In experimenten met mannelijke ratten met *in situ* vaginaweefsel als gevolg van prenatale en neonatale behandeling met het anti-androgeen cyproteron, werden na castratie en ovariumimplantatie weliswaar cyclische vaginale veranderingen waargenomen, maar regelmatige cycliciteit trad ook hier niet op (Neumann et al., 1970a).

Het is bij bovengenoemde experimenten moeilijk uit te maken of het ontbreken van regelmatige vaginale cycliciteit duidt op ontbreken van regelmatige cycliciteit in de ovarium-implantaten bij deze dieren, of dat getransplanteerd vagina-weefsel geen goede indicator is voor normale cyclische ovariumactiviteit. Eerder genoemde experimenten wezen uit, dat de relatie tussen vagina-epitheel en ovariumactiviteit onder experimentele omstandigheden af kan wijken van die onder normale omstandigheden. Aangezien in de loop van de in latere hoofdstukken te beschrijven experimenten dagelijkse uitstrijken van getransplanteerd vagina-weefsel een zeer belangrijke rol gaan vervullen, lijkt het gewenst allereerst de morfologie en uitstrijken van getransplan-

teerd vaginaweefsel te bestuderen in relatie tot normale ovarium-activiteit.

## MATERIAAL EN METHODEN

### *Transplantatie van vaginaweefsel onder de abdominale huid*

De hele of halve, nog gesloten vagina van een prepuberale, vrouwelijke rat werd onder de abdominale huid van de recipiënt gebracht. Na 10-20 dagen werd de huid boven en de wand van het inmiddels 'aangeslagen' en onder invloed van ovariumhormonen snel uitgroeiende vaginatransplantaat geïncideerd. De randen van de incisie in het transplantaat werden zodanig aan de randen van de huidincisie vastgehecht, dat een 'vagina-opening' ontstond. Het was mogelijk om hiervan gedurende lange tijd -tot meer dan 1 jaar- dagelijkse uitstrijken te maken.

Een soortgelijke techniek werd het eerst beschreven door Martins (1932) en is later door een aantal auteurs toegepast bij muizen (Gardner & Argyris, 1956; Gibbs & Browning, 1960) en ratten (Yazaki, 1959 en 1960; Harris, 1964).

### *Transplantatie van vaginaweefsel onder het nierkapsel*

Een klein stukje vaginawand van een prepuberale vrouwelijke rat, ter grootte van ongeveer  $1 \text{ mm}^2$ , werd onder het nierkapsel gebracht. De cellagen, die onder invloed van ovariumhormonen in het epitheliale oppervlak gevormd en vervolgens afgestoten worden, blijven onder het nierkapsel aanwezig; zij worden op het stukje vagina-epitheel opgestapeld in dezelfde volgorde, als die waarin ze werden afgestoten.

Doorsneden van dergelijke opstapelingen van epitheelcellen konden een nauwkeurig beeld geven van de hormonale invloeden, waaraan het vagina-epitheel gedurende de periode van implantatie blootgesteld was geweest.

Deze techniek werd eerder toegepast door o.a. Zeilmaker (1962), Kawashima (1964) en Flerko et al. (1967).

Vaginatransplantaten werden bestudeerd in 5-daags cyclische



vrouwelijke ratten en AC-♂♂ . Bij de laatstgenoemde dieren werd ovulatie en CL-vorming geïnduceerd door ECS-POA. (Zie Materiaal en Methoden: Hoofdstuk 4).

## RESULTATEN

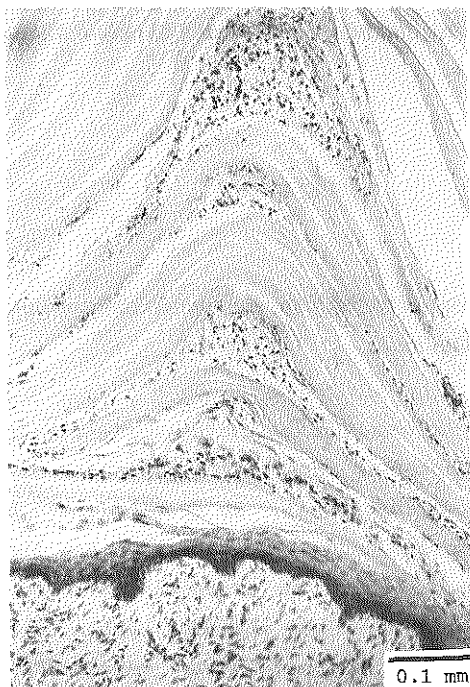
### *exp.1 Dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten onder de abdominale huid*

Bij 7 *cyclische vrouwelijke ratten* werden 5-daags cyclische veranderingen waargenomen in uitstrijken van onder de abdominale huid getransplanteerd vaginaweefsel. De cytologie van het implantaat vertoonde een enigzins anders cycluspatroon dan die van de *in situ* vagina van dezelfde dieren. Op de derde dioestrusdag waren uitstrijken van de *in situ* vagina over het algemeen leukocytair of mucus; de uitstrijken van het vaginatransplantaat vertoonden over het algemeen slechts kernhoudende epitheelcellen. Op de pro-oestrusdag bevatten uitstrijken van de *in situ* vagina over het algemeen slechts kernhoudende epitheelcellen, uitstrijken van het vaginatransplantaat slechts gecornificeerde cellen. Een en ander is weergegeven in tabel 2.

Bij AC-♂♂ met een ovariumtransplantaat werd ononderbroken cornificatie waargenomen, zoals op grond van de ovariummorfologie verwacht mocht worden (Goodman, 1934) en zoals ook eerder werd beschreven (Yazaki, 1959). Vanaf de tweede dag na ECS-POA waren uitstrijken gedurende 2-5 dagen leukocytair; daarna trad opnieuw ononderbroken cornificatie op. Onderzoek van ovariumtransplantaten in deze dieren wees uit dat ECS-POA niet in alle gevallen gevolgd was door CL-vorming.

### *exp.2 Microscopisch onderzoek van onder het nierkapsel getransplanteerd vagina-epitheel*

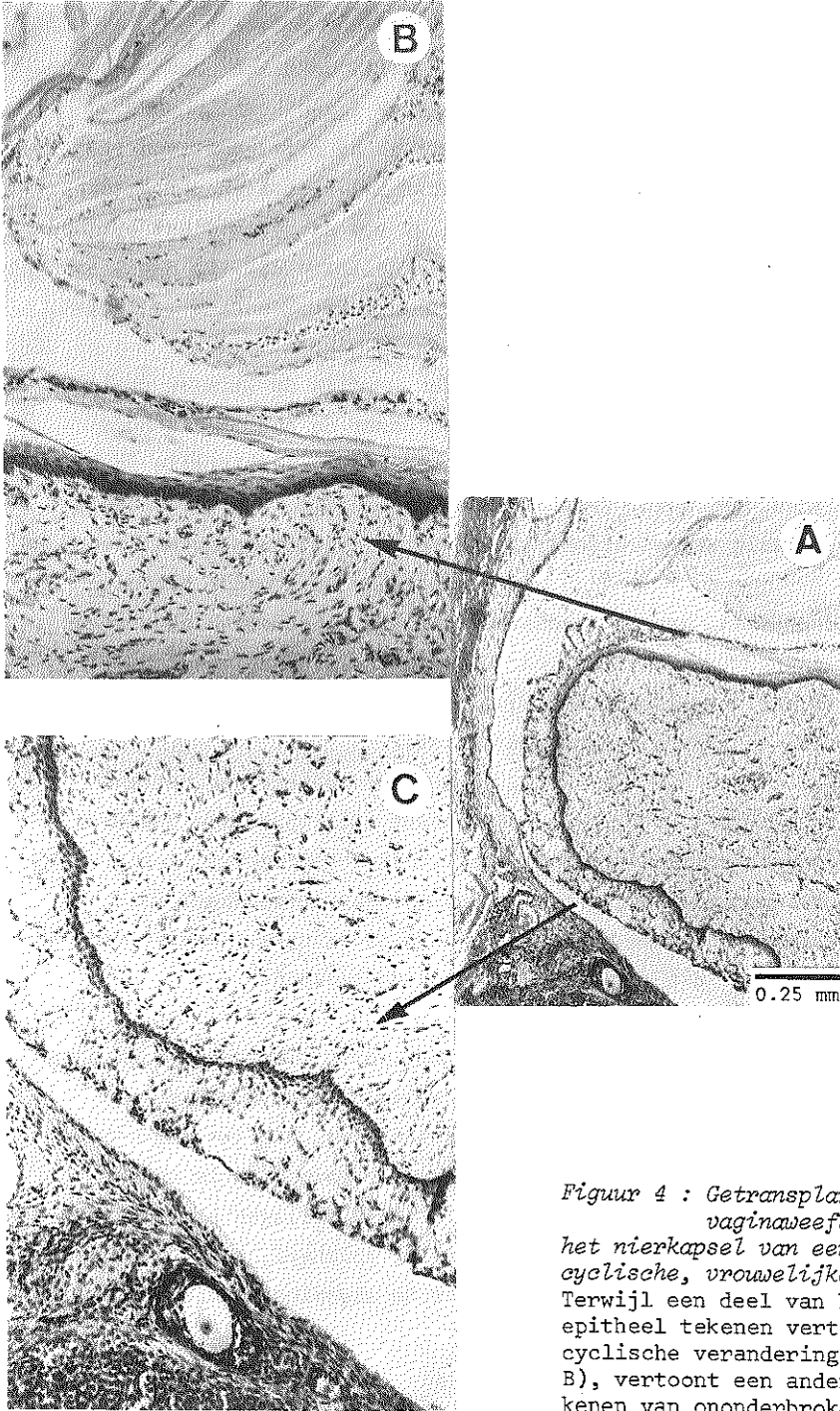
Bij *cyclische vrouwelijke ratten* vertoonden doorsneden door de van het vagina-epitheel afgestoten cellagen opeenvolgingen van breed -meer dan 10 cellagen dikke- banden met kernloze, gecornificeerde



*Figuur 3 : Getransplanteerd vagina-epitheel onder het nierkapsel van een 5-daags cyclische, vrouwelijke rat.*

Het transplantaat werd verwijderd op de oestrusdag. Op de foto zijn boven het vagina-epitheel (onder op de foto zichtbaar) afwisselend brede banden met gecornificeerde cellen -gevormd telkens op dioestrus-3, pro-oestrus en oestrus- en smalle banden met kernhoudende cellen -gevormd op dioestrus-1 en -2- zichtbaar. Opvallend is het totaal ontbreken van tekenen van leukocytenpenetratie tijdens de vroege dioestrusfase.

In de oudere afgestoten lagen met kernhoudende epitheelcellen (op de foto naar boven) zijn de celkernen pyknotisch.



*Figuur 4 : Getransplanteerd  
vaginaweefsel onder  
het nierkapsel van een 5-daags  
cyclische, vrouwelijke rat.  
Terwijl een deel van het vagina-  
epitheel tekenen vertoont van  
cyclische veranderingen (detail  
B), vertoont een ander deel te-  
kenen van ononderbroken mucif-  
ficatie (detail C).*

cellen, onderbroken door smalle -2 tot 5 cellagen dikke- banden kernhoudende, meest blazige cellen. In de oudere lagen kernhoudende cellen waren de celkernen meestal pyknotisch of gefragmenteerd (fig.3). De jongst afgestoten cellagen van het epitheel bestonden uit gecornificeerde cellen op dag 0, 3 en 4 (tabel 2) van de cyclus; het epitheel was op die dagen sterk ontwikkeld en vele cellagen dik. Op dag 1 en 2 (tabel 2) bestonden de jongste cellagen uit kernhoudende cellen; het epitheel was dan slechts enkele cellagen dik.

In tegenstelling tot hetgeen gevonden werd in de *in situ* vagina en in het boven beschreven transplantaat onder de abdominale huid werd op geen der dagen van de cyclus leukocytaire infiltratie in het vagina-epitheel gevonden. Twee afwijkingen van dit 'normale' beeld werden regelmatig aangetroffen; a. als het vaginatransplantaat gedurende lange tijd onder het nierkapsel had gezeten, was de opeenstapeling van achtereenvolgens afgestoten cellagen dikwijls verstoord. Boven het vagina-epitheel bleef dan slechts een ongeordende massa cellen aanwezig, met hier en daar samenhangende schilfers verhoornde cellen;

b. soms vertoonde een vaginatransplantaat niet eenzelfde beeld langs het gehele epitheliale oppervlak. Zoals weergegeven in fig.4 kon het voorkomen, dat een gedeelte van het vagina-epitheel duidelijke tekenen vertoonde van cyclische veranderingen, terwijl een ander deel slechts uit gemucificeerde cellen bestond.

Bij AC-♂♂ met een ovariumtransplantaat vertoonden doorsneden door de van het vagina-epitheel afgestoten cellagen opeenvolgingen van gecornificeerde cellen. Bij vaginatransplantaten, die 5-8 dagen na ECS-POA waren verwijderd, was de voortdurende cornificatie onderbroken door een smalle band, bestaande uit 2-5 cellagen kernhoudende blazige cellen. Leukocytenpenetratie in het epitheel, zoals waargenomen was in het vaginatransplantaat onder de abdominale huid was hier niet aanwezig.

## DISCUSSIE

51 *Dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten onder de abdominale huid.*

De waarnemingen met *cyclische vrouwelijke ratten* tonen aan, dat cyclische veranderingen in ovariumactiviteit gevolgd kunnen worden aan de hand van dagelijkse uitstrijken van getransplanteerd vagina-weefsel. De vaginale cyclus van het transplantaat heeft echter een enigzins ander verloop dan die van de *in situ* vagina: terwijl bij het transplantaat kernhoudende cellen als teken van oestrogene stimulatie reeds op dag 3 van de cyclus overheersen, in de uitstrijk is dit bij de *in situ* vagina pas op dag 4 het geval.

Een uitstrijkpatroon met overheersend kernhoudende epitheelcellen op dag 3 van de cyclus komt overigens bij 5-daags cyclische ratten ook onder normale omstandigheden voor (Nequin & Schwartz, 1971; Kaasjager, 1971; Wildschut, 1972). Het feit echter dat in bovengenoemd experiment de cyclus van het vaginatransplantaat verschilde van die van de *in situ* vagina toont aan, dat getransplanteerd vagina-weefsel anders reageert op gelijke hormonale omstandigheden dan *in situ* vagina-weefsel. Het uitstrijkpatroon van de vaginatransplantaten onderstreept enerzijds dat de produktie van oestrogene hormonen in 5-daags cyclische ratten reeds op dag 2 van de cyclus begint, zoals dit ook bij 4-daags cyclische dieren het geval is (Nequin & Schwartz, 1971; Brown-Grant et al., 1971) en anderszijds dat de door niet-functionele CL geproduceerde hoeveelheden progesteron niet anders dan gering kunnen zijn (Uchida et al., 1969). Als belangrijke hoeveelheden geproduceerd zouden worden, dan zou dit tot mucificatieverschijnselen van het vagina-epitheel aanleiding moeten geven (Barker & Walker, 1966). Het vervroegd verschijnen van tekenen van oestrogene stimulatie in uitstrijk en microscopische morfologie van epitheel van getransplanteerd vagina-weefsel zou een aanwijzing kunnen zijn, dat getransplanteerd vagina-weefsel gevoeliger

is voor oestrogene hormonen dan *in situ* vaginaweefsel. Uit een experiment, waarin de gevoeligheid van getransplanteerd en *in situ* vaginaweefsel werd vergeleken voor exogene oestrogene hormonen, werd echter het tegengestelde resultaat verkregen (Gardner & Argyris, 1956). Het lijkt niet mogelijk om op basis van de boven verkregen gegevens hieromtrent zinvolle uitspraken te doen.

Uitstrijken van AC- $\beta\beta$  met een ovariumtransplantaat bevatten slechts gecornificeerde cellen. In overeenstemming hiermee werden nooit CL in ovariumtransplantaten aangetroffen. ECS-POA gaf aanleiding tot leukocytaire uitstrijken gedurende 2-5 dagen vanaf de tweede dag na ECS-POA. In gevallen, waarin ECS-POA gevolgd werd door CL-vorming, mocht dit effect verwacht worden, aangezien de tweede dag na ECS-POA de eerste dag van de dioestrusfase van de door ECS-POA geïnduceerde 'cyclus' representeerde. De korte periode met onderbreking van vaginale cornificatie duidde overigens aan, dat door ECS-POA geïnduceerde CL geen functionele activiteit vertoonden, in overeenstemming met soortgelijke waarnemingen van Zeilmaker (1962; 1963). Leukocytaire uitstrijken traden echter ook op, als ECS-POA niet door CL-vorming in de ovariumtransplantaten werd gevolgd. Een verklaring voor dit verschijnsel zou kunnen zijn, dat ECS-POA weliswaar geen ovulatoire hoeveelheid gonadotropine uit de hypofyse vrijmaakte, maar wel een voldoende grote hoeveelheid om de hypofyse-ovarium balans te verstoren en daarmee wellicht de voortdurende afgifte van oestrogene follikelhormonen te onderbreken. Aangezien vaginale cornificatie alleen aanwezig blijft bij voortdurende stimulatie door oestrogene hormonen (Barker & Walker, 1966), kan een dergelijke verstoring zich gemakkelijk manifesteren in onderbreking van de vaginale cornificatie door leukocytaire uitstrijken.

## § 2 *Microscopisch onderzoek van onder het nierkapsel getransplanteerd vagina-epitheel*

In *cyclische vrouwelijke ratten* resulteerden cyclische veranderingen in ovariumactiviteit in de vorming van afwisselend brede banden met gecornificeerde cellen en smalle banden met kernhoudende cellen. Het grote aantal cellagen, dat gedurende dag 3, 4 en 0 van de cyclus werd afgestoten, laat zich gemakkelijk verklaren op grond van de

prolifererende en cornificerende werking van de in die dagen aanwezige oestrogene hormonen. De vorming van slechts enkele lagen kernhoudende cellen op dag 1 en 2 van de cyclus -welke cellen overigens geen teken van mucificatie vertoonden- weerspiegelt het feit, dat gedurende deze twee dagen slechts weinig ovariumhormonen in het bloed aanwezig zijn.

Het meest opvallende verschijnsel was de totale afwezigheid van leukocytenpenetratie in het vaginale epitheel gedurende de gehele cyclus. Aangezien leukocytenpenetratie wel werd gezien gedurende de cyclus in dagelijkse uitstrijken van het transplantaat onder de abdominale huid, moet geconcludeerd worden, dat de transplantatie zelf niet tot afwezigheid van leukocytenpenetratie gedurende de cyclus leidde. Deze leukocytenpenetratie wordt derhalve blijkbaar niet uitsluitend veroorzaakt door hormonale factoren, maar is mede afhankelijk van lokale omstandigheden.

Het feit tenslotte, dat verschillende delen van het epitheel van een vaginatransplantaat onder het nierkapsel een geheel verschillende cytologie konden vertonen (fig. 4), toont aan, dat interpretatie van de toestand van het oppervlak van getransplanteerd vaginaweefsel als indicator van ovariumactiviteit slechts met voorbehoud mogelijk is.

De transplantaten in *AC-♂♂ met ovariumtransplantaten* vertoonden een ononderbroken opeenstapeling van gecornificeerde cellen. Inductie van CL-vorming door ECS-POA had bij deze dieren onderbreking van de cornificatie door een dunne band kernhoudende cellen tot gevolg. Ook hier werd nooit massale leukocytenpenetratie van het vaginale epitheel waargenomen.

#### SAMENVATTING

Dagelijkse uitstrijken en het microscopisch aspect van getransplanteerd vaginaweefsel kunnen worden gebruikt als indicator van ovariumactiviteit. De veranderingen, die zich in getransplanteerd vaginaweefsel voordoen onder invloed van veranderingen in ovariumactiviteit, zijn niet exact gelijk aan die van *in situ* vaginaweefsel. Het zal in nieuwe experimentele omstandigheden voortdurend nodig zijn om de relatie tussen ovariumactiviteit en genoemde indicators vast te stellen.

## HOOFDSTUK 4 : CYCLISCHE OVARIUMACTIVITEIT IN NC-♂♂

## INLEIDING

Verscheidene auteurs hebben de vondst van Pfeiffer (1936) bevestigd, dat spontane CL-vorming in ovariumtransplantaten in mannelijke ratten verkregen kan worden, als deze dieren kort na de geboorte zijn gecastreerd (Yazaki, 1960; Harris, 1964; Kawashima, 1964; Gorski, 1966; Adams Smith & Peng, 1967; Ladosky et al., 1969; Machida, 1970; Henzl et al., 1971). CL-vorming kon ook worden verkregen na prenatale en neonatale behandeling van mannelijke ratten met cyproteron(-acetaat), gevolgd door castratie op dag 10 (Neumann et al., 1970a).

Dat CL-vorming cyclisch gebeurde, werd geconcludeerd uit dagelijkse waarnemingen en kleurenfoto's van in de oogkamer geplaatste ovariumtransplantaten (Harris, 1964), cyclische veranderingen in getransplanteerd vaginaweefsel (Yazaki, 1960; Harris, 1964) of *in situ* vagina-weefsel (Neumann et al. 1970b) en cyclische veranderingen in optreden van reacties van vrouwelijk bronstgedrag. In geen van deze gevallen echter werd de voor normale vrouwelijke ratten karakteristieke, regelmatige 4 en/of 5-daagse cycliciteit beschreven.

Bovengenoemde waarnemingen hebben het door Pfeiffer (1936) geïntroduceerde concept van de geslachtsdifferentiatie van het ovulatiemechanisme (fig. 1) in wezen onaangetast gelaten (Neumann et al., 1970b).

Er zijn echter in de loop van de jaren waarnemingen aan vrouwelijke ratten beschreven, die doen twijfelen aan de *bipotentiële* aard van de oorspronkelijk identieke aanleg van het ovulatiemechanisme. Segal & Johnson (1959) beschreven bij vrouwelijke ratten die neonataal met 100 µg TP waren behandeld, een overgangsvorm tussen het 'mannelijk' en 'vrouwelijk' type ovulatiemechanisme. Een aantal dieren vertoonde namelijk weliswaar het voor het mannelijke type karakteristieke uitblijven van ovulatie, maar ovulatie kon wel optreden na copulatie; een dergelijke reactie werd als een kenmerk van het 'vrouwelijk' type ovulatiemechanisme beschouwd. De door hen aangevoerde verklaring



voor deze waarneming was, dat wellicht een gedeelte van het neonataal toegediende TP uit de injectieplaats was weggelekt, zodat het TP slechts gedeeltelijk actief kon zijn geweest, te weinig om vermannelijking van het ovulatiemechanisme volledig tot stand te brengen.

Gorski & Barraclough (1963) beschreven, dat een éénmalige injectie van 5µg TP bij vrouwelijke ratten op dag 5 slechts bij een gedeelte van de dieren vermannelijking van het ovulatiemechanisme tot gevolg had. Swanson & van der Werff ten Bosch (1964a) beschreven, dat vrouwelijke ratten, die op dag 5 een injectie met 5µg TP hadden gekregen, vlak na de puberteit allen cyclische ovariumactiviteit vertoonden en fertiel waren, maar dat dezelfde dieren op een leeftijd van 21 weken anovulatoir en infertiel waren geworden. Het leek erop, dat het effect van de neonataal toegediende kleine dosis, TP zich pas met een zekere latentietijd manifesteerde: daarom werd dit verschijnsel het 'incomplete or delayed early androgen syndrome' (Van der Werff ten Bosch et al., 1971) genoemd. Het is door verscheidene auteurs bevestigd (Gorski, 1968; Arai & Gorski, 1968c; Luttge & Whalen, 1970; Arai, 1971). Het werd geïnterpreteerd als een tussenvorm in de organisatie van het ovulatiemechanisme, waarbij slechts gedurende een korte periode ovulaties op konden treden.

Zoals reeds eerder werd beschreven, lijkt het aannemelijk dat de testes van ratten reeds in de prenatale periode androgenen produceren; deze androgenen hebben in deze periode waarschijnlijk een biologische betekenis, nl. bij de differentiatie van de inwendige genitalia (Jost, 1970). Pasgeboren mannelijke ratten verschillen derhalve met betrekking tot blootstelling aan androgene hormonen van pasgeboren vrouwelijke ratten. Mogelijkerwijs hebben prenatale en vroegpostnatale androgenen een effect gehad op het zich ontwikkelende ovulatiemechanisme.

Er zijn experimenten beschreven, waaruit tot verschillen tussen neonataal gecastreerde mannelijke ratten en vrouwelijke ratten onder invloed van perinatale androgenen geconcludeerd is (Levine & Mullins, 1967) resp. zou kunnen worden (Grady et al., 1965; Taleisnik et al., 1969 en 1971; Neill 1972). Levine & Mullins (1967) beschreven dat eenzelfde dosis TP, toegediend in de neonatale periode aan vrouwelijke of neonataal gecastreerde mannelijke ratten, bij deze laatste een ingrijpender effect had op reacties van bronstgedrag na hormonale

voorbehandeling op volwassen leeftijd; het verschil werd verklaard door aan te nemen, dat het exogene TP in de mannelijke ratten cumulatief werkte op het effect van de endogeen aanwezige androgenen. Reeds Pfeiffer (1936) had aangetoond dat de ontwikkeling van het mechanisme van regulatie van vrouwelijk bronstgedrag in nauwe relatie stond tot de ontwikkeling van het ovulatiemechanisme.

Grady et al. (1965) beschreven grote verschillen in vrouwelijk bronstgedrag tussen NC- $\delta\delta$  en vrouwelijke ratten na toediening van gelijke hoeveelheden geslachtshormonen.

Taleisnik et al. (1969 en 1971) beschreven verschillen in secretie van gonadotropine na toediening van geslachtshormonen bij vrouwelijke ratten en NC- $\delta\delta$ .

Neill (1972) beschreef dat slechts 50 % van de door hem onderzochte NC- $\delta\delta$  een prolactine-'surge' vertoonden na injectie van oestradiolbenzooat; deze reactie werd bij alle onderzochte vrouwelijke ratten verkregen. Zoals eerder beschreven, werd in deze laatste gevallen prolactine-'surge' in verband gebracht met de vrouwelijke organisatie van het ovulatiemechanisme.

Op grond van het bovenstaande werden twee vragen in het volgende bestudeerd:

1. vertoont de activiteit van ovariumtransplantaten in NC- $\delta\delta$  een regelmaat, welke vergelijkbaar is met die van ovariumactiviteit in normale vrouwelijke ratten? Deze regelmaat zal onderzocht worden ten aanzien van: cyclusduur (*exp. 1, 2 en 3*), aantal ovulerende follikels per cyclus (*exp. 4*) en verloop van processen, die ovulatie bij vrouwelijke ratten aanzetten en begeleiden (*exp. 5 en 6*).
2. is het mogelijk aan ovariumactiviteit in NC- $\delta\delta$  aspecten te herkennen die duiden op effecten van perinataal door de testes geproduceerde androgenen? Hiertoe zal ovariumactiviteit op verschillende tijdstippen na ovariumimplantatie worden bestudeerd (*exp. 7, 8 en 9*).

## MATERIAAL EN METHODEN

*Proefdieren*

Voor deze experimenten werden ingeteelde ratten gebruikt. De dieren waren van een van de Wistar-stam afgeleide R-stam (witte ratten) of  $(\varphi R \times \delta U)F_1$  hybride dieren. U-ratten waren lichtbruin gevlekt ('hooded'). De RU-dieren vertoonden bruin-zwarte kleuring volgens een patroon als de U-ratten.

De dieren werden in het laboratorium zelf gekweekt; ze waren daar in 1969 vanuit het Antoni van Leeuwenhoek-huis in Amsterdam ingevoerd; aldaar zijn de R- en U-stam reeds meer dan 80 generaties ingeteeld.

Een aantal kenmerken van ovariumactiviteit in R- en RU- $\varphi\varphi$  is in het onderstaande verzameld; in latere experimenten zal regelmatig een vergelijking worden gemaakt tussen kenmerken van ovariumactiviteit van (R)- en (RU)NC- $\delta\delta$  en overeenkomstige vrouwelijke dieren.

	(R)- $\varphi\varphi$ $\varphi\varphi$	(RU)- $\varphi\varphi$ $\varphi\varphi$
ovariumactiviteit op een leeftijd van 3-6 maanden	minder dan 50% regelmatig 5-daags cyclisch; geen andere regelmatige cycluspatronen .....(1)	minstens 85 % regelmatig 5-daags cyclisch; geen andere regelmatige cycluspatronen .....(2)
ovariumactiviteit op een leeftijd van 12-18 maanden	ongeveer 50 % van de cycli met luteale activiteit ('spontane pseudozwangerschappen').(2)	overgang van regelmatige cycliciteit naar persistente oestrus .....(3)
aantal eieren per cyclus (spreiding)	11.4 (---) ....(1)	11.7 (10 - 14) .....(2)
aantal CL per cyclus (spreiding)	----	11.8 ( 9 - 15) .....(2)
informatiebronnen:	(1) Welschen, pers. meded. (2) pers. waarn. (3) Zeilmaker, 1969	

Zwangere dieren werden enige dagen voor de verwachte partus apart gezet in een macrolonbak ( l x b x h : 38 x 25 x 16 cm); gedurende de eerste week na de geboorte werd de nestgrootte gereduceerd tot 8. Het

spenen van de jongen geschiedde op dag 21-25; vanaf die tijd werden de dieren met 4 of 5 bijeen in soortgelijke bakken gehouden.

De temperatuur in de proefdierruimten was 20 - 24<sup>o</sup>C; de luchtvochtigheid 50 - 60 %. De dieren werden blootgesteld aan 14 uur licht (TL-buizen) en 10 uur donker per etmaal; het midden van de donkere periode viel samen met middernacht.

De dieren hadden *ad libitum* beschikking over voer (Hope Farms: standard laboratory diet) en kraanwater.

### *Neonatale castratie*

Pasgeboren mannelijke ratten werden van de moeder weggehaald en onder koude-anaesthesie, zoals beschreven door Clark (1935 a,b) en Pfeiffer (1936) gecastreerd. Op het moment van castratie waren de dieren meestal enige uren oud: melk was reeds zichtbaar in de maag. De testes werden verwijderd via een enkele incisie in de ventrocaudale buikwand; de incisie werd gehecht met atraumatisch hechtgaren. Als de dieren onder een lamp weer op temperatuur gekomen waren, werden ze bij de moeder en overige nestgenoten teruggeplaatst.

De mortaliteit als gevolg van de operatie variëerde van 10 tot 30 %. Extra mortaliteit ten gevolge van weigeren door de moeder de jongen weer op te nemen, werd niet waargenomen. De operatie had geen duidelijke invloed op de overlevingskansen: de mortaliteit in groepen, welke tot een leeftijd van meer dan een jaar werden aangehouden, was nihil.

### *Vagina- en ovariumtransplantatie*

Op een leeftijd van 30-150 dagen werd het ovarium van een pre-puberale vrouwelijke rat onder het nierkapsel van de linkernier gebracht. Een deel van de vagina van dezelfde donor werd onder de abdominale huid geplaatst overeenkomstig de procedure, beschreven in hoofdstuk 3.

Uitstrijken van vaginatransplantaten werden dagelijks gemaakt, 5 - 6 dagen per week, 's morgens tussen 08.00 en 10.00 uur.

### *Microscopisch onderzoek.*

Voor histologisch onderzoek werden organen gefixeerd in 5% formaline of Bouin's fixatie-oplossing. Coupes van 5 of 10  $\mu$  werden -in serie of 1 op 10- opgeplakt en gekleurd met haematoxyline en eosine.

Het aantal follikels in ovaria of ovariumtransplantaten, dat ovuleerde ófwel per cyclus ófwel kunstmatig na ECS-POA werd bepaald aan de hand van seriecoupes van deze organen.

### *Kwantificering van vrouwelijk bronstgedrag*

Vrouwelijk bronstgedrag van NC-♂♂ werd geobserveerd in halfcirkelvormige, hoge kooien, die van boven open waren en van voren afgedekt met glas. In iedere kooi werd één NC-♂ samen met één intacte mannelijke rat geobserveerd. Als kwantitatieve index van vrouwelijk bronstgedrag werd het Lordose-Quotiënt (LQ) bepaald: daartoe werd gedurende de periode van 10 mounts, al dan niet gepaard gaande met 'pelvic thrusts', door de intacte mannelijke ratten of ten hoogste 10 minuten het percentage van de keren bepaald, dat de NC-♂♂ een lordose-reactie vertoonden.

### *Elektrochemische stimulatie van de area preoptica (ECS-POA) of mediale amygdala (ECS-AME)*

ECS-POA werd altijd unilateraal uitgevoerd; ECS-AME werd meestal unilateraal, soms echter bilateraal uitgevoerd.

In beide gevallen bestond de procedure uit het inbrengen van een stalen elektrode met behulp van een stereotactisch instrument, waarna een gelijkstroom (elektrode = anode) gedurende enige tijd werd doorgeleid. De resulterende ijzerafzetting rondom de niet-geïsoleerde elektrodepunt in het hersenweefsel wordt verondersteld een stimulerend effect op de neuronen ter plaatse te hebben (Everett & Radford, 1961).

De rat werd zodanig in het stereotactisch instrument geplaatst, dat de coördinaten van de betreffende hersendelen volgens de atlas van de Groot (1959) bepaald konden worden.

De coördinaten van de *area preoptica* bleken enigzins afwijkend te zijn van die, welke in voornoemde atlas zijn aangegeven. Gebruikt werd: voor-achter + 7.7 mm; onder-boven - 1.3 mm; links-rechts 0.8 mm. De voor de stimulatie gebruikte stroomsterkte bedroeg in het algemeen 0.1 mA, welke gedurende 90 sec. werd doorgeleid. De resulterende laesie bevond zich over het algemeen tussen de *commissura anterior* en het *chiasma opticum*; het steekkanaal van de elektrode perforeerde meestal de *commissura anterior*.

Als coördinaten voor de mediale *amygdala* werden gebruikt: voor - achter + 5.0 mm; onder-boven - 2.8 mm; links-rechts 3.5 mm. De voor stimulatie gebruikte stroomsterkte bedroeg meestal 1 mA, welke gedurende 20 sec. werd gegeven. De resulterende laesie bevond zich over het algemeen geheel rostraal van het ventrale deel van de *hippocampus*, ventraal van de *tractus opticus* in het boven de mediale *amygdala* gelegen deel van het *diencephalon*, en midden in het gebied, waarin de *stria terminalis* eindigde.

## RESULTATEN

### *exp.1* Dagelijkse vagina-uitstrijken van (RU)NC-♂♂

Bij 27 (RU)NC-♂♂ werd 30 tot 60 dagen na de geboorte een ovarium geïmplanteerd. Dagelijkse uitstrijken van de vagina-transplantaten werden gemaakt vanaf 10 - 14 dagen na ovariumimplantatie.

Bij alle ratten bevatten de uitstrijken van de eerste dagen uitsluitend gecornificeerde cellen. Twaalf tot 18 dagen na ovariumtransplantatie traden voor het eerst leukocytaire uitstrijken op.

De eerste leukocytaire uitstrijk was bij 3 / 27 dieren het begin van een 12 - 15 dagen durende periode met vaginale mucificatie. Volgend op deze periode kwamen 5-daagse cyclische veranderingen in dagelijkse vagina-uitstrijken voor. De overige 24 dieren vertoonden slechts 5-daagse cyclische veranderingen. De morfologie van de 5-daagse cyclische veranderingen in de uitstrijken was over het algemeen gelijk aan

die van cyclische vrouwelijke ratten (tabel 2): opeenvolgingen van 3 dagen met leukocyten-vrije uitstrijk en 2 dagen met leukocytaire uitstrijk.

Na een beperkt aantal (9-20) voornamelijk 5-daagse cycli gedurende 2-4 maanden na implantatie van het ovarium, hielden de cyclische veranderingen in dagelijkse uitstrijken op. Er werden dan nog slechts uitstrijken met gecornificeerde cellen verkregen.

Geconcludeerd wordt, dat (R)NC-♂♂ na implantatie van vagina- en ovariumweefsel gedurende een beperkte periode cyclische veranderingen in vagina-uitstrijken vertonen, gevolgd door permanente vaginale cornificatie.

#### *exp.2 Dagelijkse vagina-uitstrijken van (R)NC-♂♂*

Bij 30 (R)NC-♂♂ werd 30 - 40 dagen na de geboorte een ovarium geïmplantieerd. Dagelijkse uitstrijken van de vagina-transplantaten werden gemaakt vanaf 10 - 14 dagen na de ovarium-implantatie. Uitstrijken bevatten gedurende de eerste uitstrijkdagen uitsluitend gecornificeerde cellen.

Twaalf tot 23 dagen na ovarium-implantatie traden voor het eerst leukocytaire uitstrijken op. De eerste leukocytaire uitstrijk was bij 27 van de 30 dieren het begin van een 20 - 26 dagen durende periode met vaginale mucificatie; bij de overige 3 dieren was deze het begin van een 5-daagse cyclus.

Na deze eerste 'cyclus' traden 5-daagse cycli en langdurige perioden met vaginale mucificatie in onregelmatige afwisseling op. Uit de groep van 30 (R)NC-♂♂ werden 24 dieren zonder verdere experimentele ingrepen gedurende lange tijd dagelijks uitgestreken. Het bleek dat na 10 - 22 als boven gedefinieerde 'cycli' permanente vaginale cornificatie optrad.

Het interval tussen ovarium-implantatie en begin van de periode met permanente vaginale cornificatie bedroeg 3.5 - 14 maanden.

Geconcludeerd wordt, dat (R)NC-♂♂ na implantatie van ovarium- en vaginaweefsel 5-daagse cyclische veranderingen in dagelijkse vagina-uitstrijken kunnen vertonen. Daarnaast komen bij deze dieren veelvuldig langdurige perioden met vaginale mucificatie voor. Na een beperkt aantal cycli treedt bij deze dieren, evenals dat bij (RU)NC-♂♂ het geval bleek te zijn, permanente vaginale cornificatie op.

### *exp.3 Correlatie van vagina-uitstrijken en ovariummorfologie*

Om te onderzoeken, hoe cyclische veranderingen in vagina-uitstrijken en ovariummorfologie met elkaar in verband stonden, werden

- op iedere dag van de 5-daagse cyclus -(RU) en (R)NC-♂♂ - ,
- gedurende langdurige perioden met vaginale mucificatie -(R)NC-♂♂ -
- gedurende perioden van permanente vaginale cornificatie -(RU) en (R)NC-♂♂ -

telkens tenminste 8 ovariumtransplantaten verwijderd.

Zoals blijkt uit fig.5 konden veranderingen in vagina-uitstrijken en ovariummorfologie gedurende de 5-daagse cyclus exact aan elkaar gecorreleerd worden. De veranderingen in ovariummorfologie gedurende de 5-daagse cyclus in NC-♂♂ bleken geheel vergelijkbaar met de cyclische veranderingen in ovariummorfologie in normale vrouwelijke ratten.

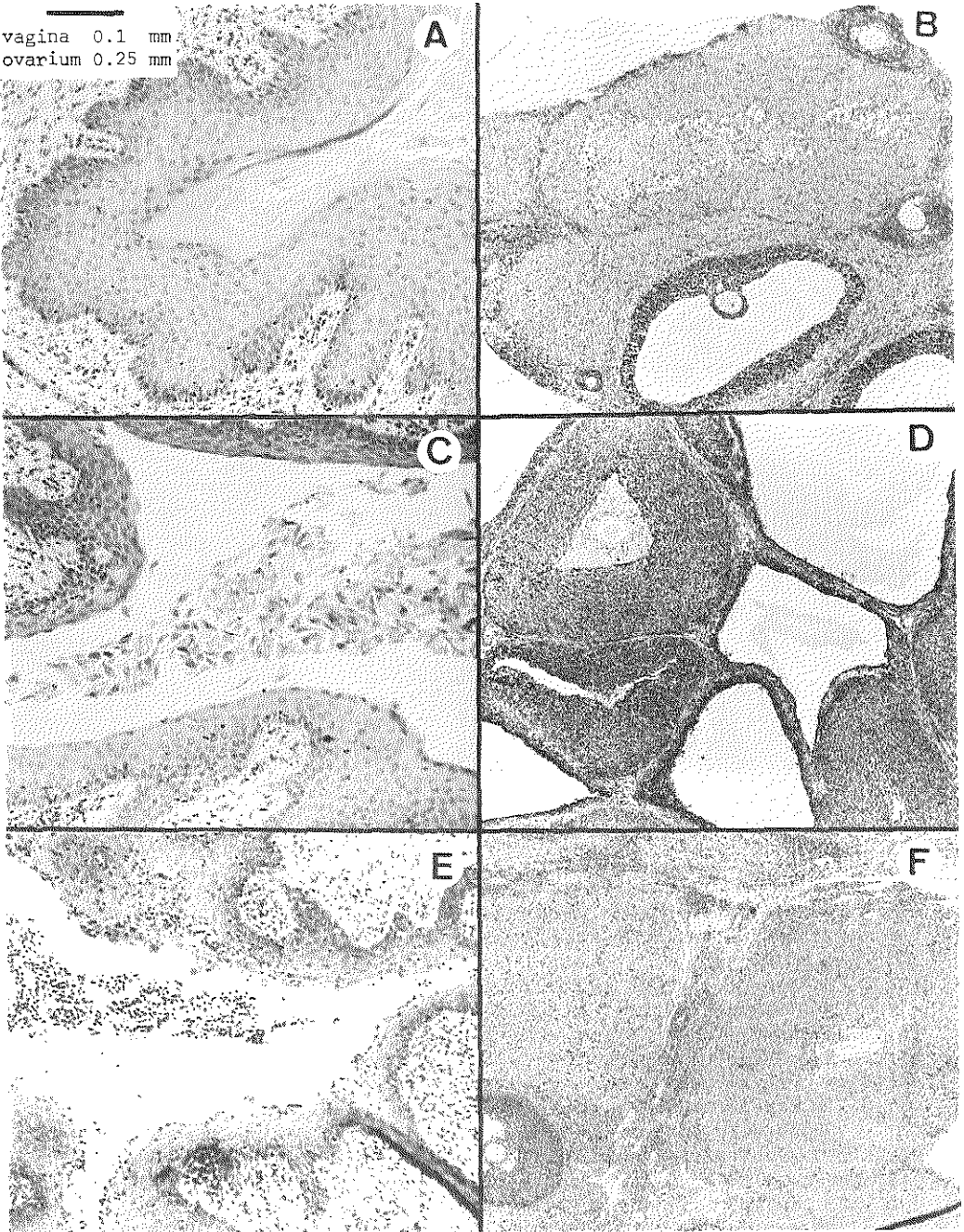
Gedurende perioden met langdurige mucificatie vertoonden ovariumtransplantaten één generatie CL (fig.6), die een grotere diameter bereikten (tot 1,5 mm) dan gedurende de 5-daagse cyclus werd waargenomen (tot 1.0 mm).

Het vagina-epitheel vertoonde enkele lagen cuboidale cellen met daarop een laag muceuze cellen. Zowel ovarium- als vaginamorfologie vertoonden een microscopisch aspect zoals aangetroffen tijdens pseudozwangerschap in normale vrouwelijke ratten (Long & Evans, 1922; Rothchild, 1965). In hoofdstuk 5 zal hierop nader worden ingegaan.

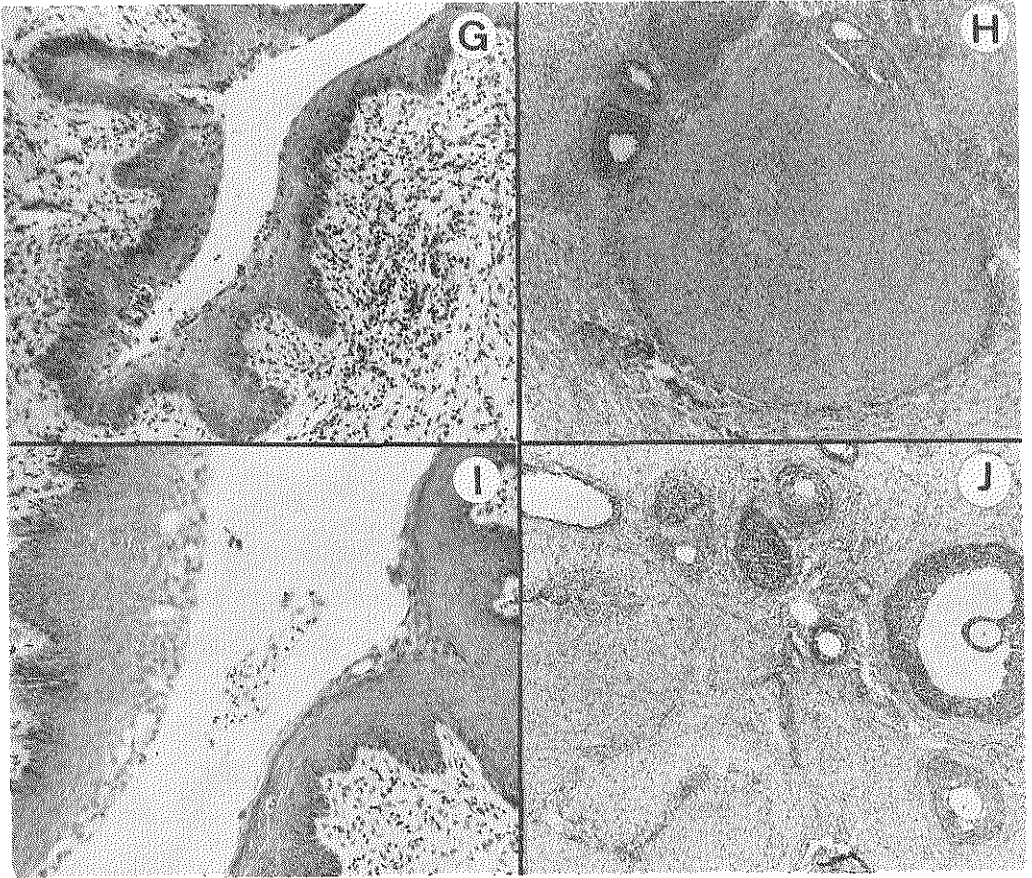
Gedurende perioden met permanente vaginale cornificatie werden slechts follikels in allerlei stadia van ontwikkeling en regressie aangetroffen (fig.7). In die ovaria, welke binnen twee weken na de laatste vaginale cyclus waren verwijderd, waren restanten van CL aanwezig.



vagina 0.1 mm  
ovarium 0.25 mm



*Figuur 5 a - n : De relatie tussen het microscopisch aspect van getransplanteerd vagina- en ovariumweefsel in 5-daags cyclische NC-33 .*



Ovarium- en vaginatransplantaten werden uit 5-daags cyclische NC- $\delta\delta$  op de verschillende dagen van de cyclus verwijderd; het tijdstip van verwijdering was voor alle, hier weergegeven transplantaten tussen 15.00 en 16:00 uur.

5 a,b De eerste dag met gecornificeerde vagina-uitstrijk (pro-oestrus).

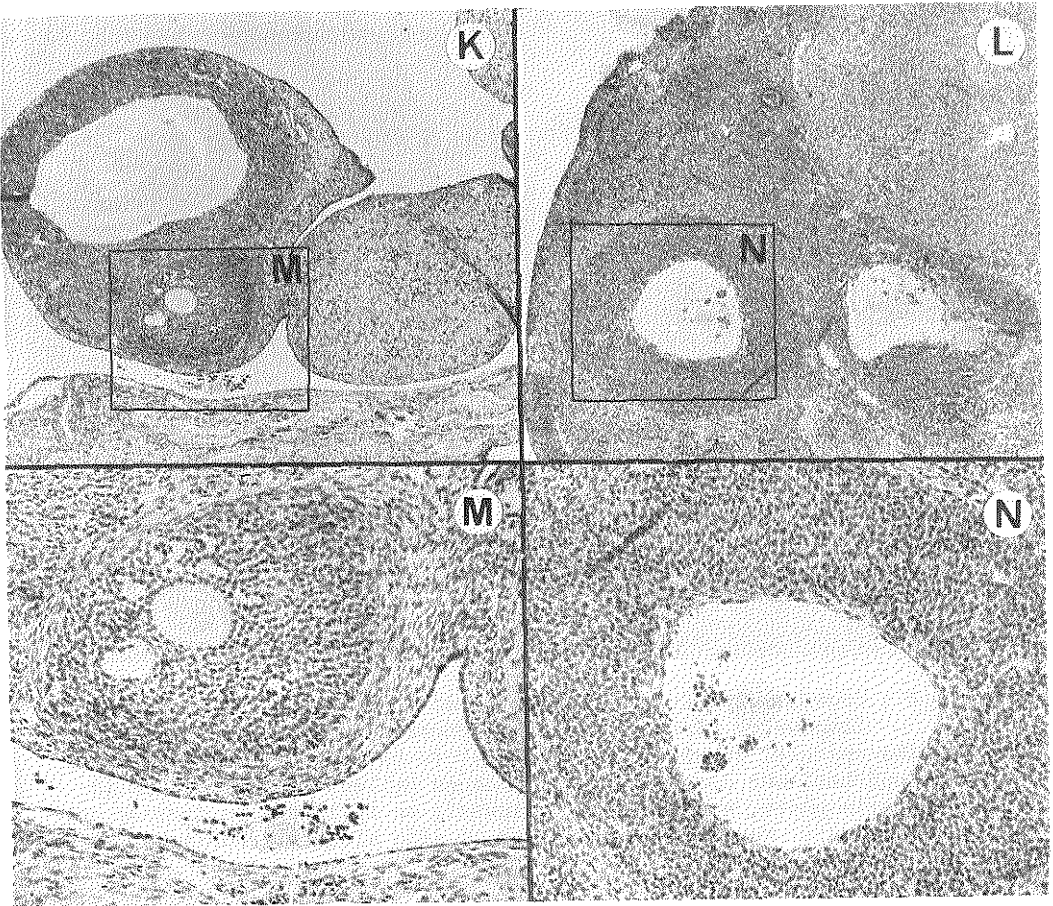
Het vagina-epitheel is maximaal ontwikkeld. Het ovarium vertoont grote follikels (diameter tot 850  $\mu$ ) met niet-gerijpte oöcyten: één ervan is in fig. b weergegeven. De in de voorgaande cyclus gevormde CL vertonen verschijnselen van luteolyse.

5 c,d De tweede dag met gecornificeerde vagina-uitstrijk (oestrus).

Bijna alle gecornificeerde cellen zijn van het vagina-epitheel afgestoten; enkele leukocyten zijn in de onder het oppervlak gelegen cellagen zichtbaar. Het ovarium vertoont post-ovulatoire follikels en gerijpte oöcyten (zie verder 5 k-n).

5 e,f De eerste dag met leukocytaire vagina-uitstrijk (dioestrus-1).

Veel leukocyten zijn in het epitheel en in het lumen aanwezig. Het ovarium vertoont een generatie basofiele CL, die meestal nog een centrale holte vertonen; in deze holte wordt soms een gerijpte oöcyt aangetroffen.



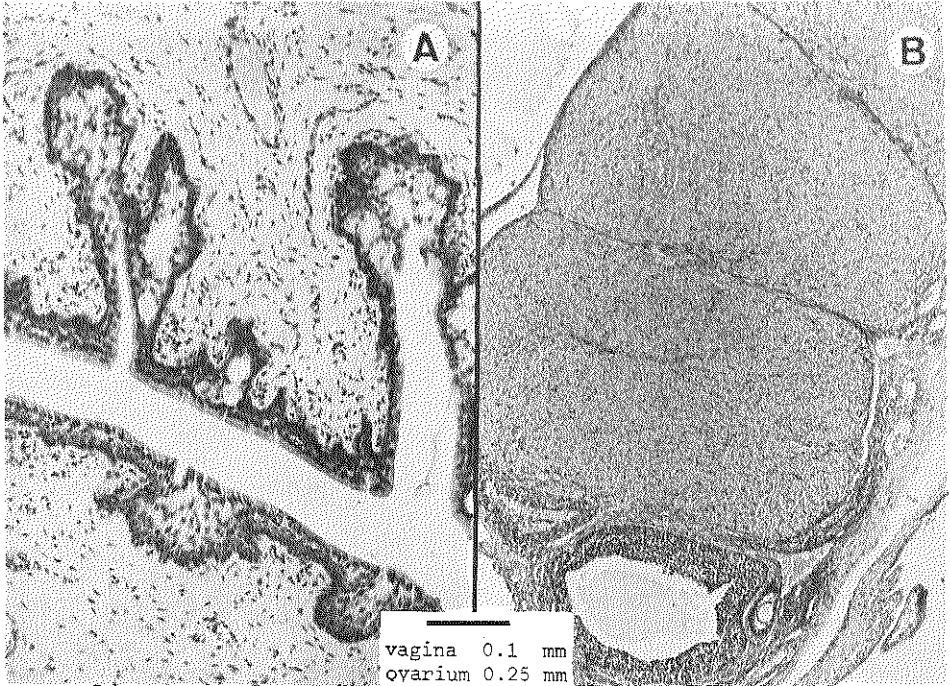
5 g, h De tweede dag met leukocytaire vagina-uitstrijk (dioestrus-2).

Er zijn enkele leukocyten in de oppervlakkige epitheelagen aanwezig. Het ovarium bevat een generatie grote, basofiele tot eosinofiele CL; de CL van de vorige cyclus zijn geatrofiëerd. Een nieuwe generatie follikels wordt zichtbaar.

5 i, j De dag met kernhoudende epitheelcellen in de vagina-uitstrijk (dioestrus-3).

Tekenen van cornificatie zijn in het prolifererende vagina-epitheel juist onder de oppervlakte zichtbaar. De nieuwe generatie follikels groeit snel uit. In de jongstgevormde CL zijn de eerste tekenen van luteolyse zichtbaar.

5 k-n Op de oestrusdag kunnen gerijpte oöcyten zowel binnen (*l, n*) als buiten (*k, m*) de postovulatoire follikels worden aangetroffen. Het percentage van de oöcyten, dat buiten de follikels kon worden aangetroffen, was erg variabel (0 - 80 %) overeenkomstig soortgelijke waarnemingen aan ovariumtransplantaten in 5-daags cyclische, vrouwelijke ratten (Welschen, 1971).



*Figuur 6 : Ovariumweefsel en vagina-epitheel in (R)NC-33 gedurende langdurige perioden met gemucificeerde vagina-uitstrijk.*

Het vagina-epitheel is enkele cellagen dik en bestaat uit een paar lagen kubisch epitheel met daarop een laag muceuze cellen. In het ovarium is een generatie grote, eosinofiele CL aanwezig en follikels in diverse ontwikkelingsstadia. Van oudere generaties CL zijn slechts atrofische restanten zichtbaar.



*Figuur 7 : Ovariumweefsel in NC-33 gedurende 'persistente oestrus' na een periode met cyclische ovariumactiviteit.*

Het ovarium bevat follikels in allerlei stadia van ontwikkeling en atresie.

Geconcludeerd wordt, dat uitstrijken van vagina-transplantaten en morfologie van ovariumtransplantaten in NC-♂♂ exact aan elkaar gecorreleerd kunnen worden. Ovariumtransplantaten in (RU)NC-♂♂ ondergaan 5-daagse cyclische veranderingen, welke in morfologisch opzicht nauw vergelijkbaar zijn met de cyclische veranderingen in ovaria van normale (RU)-♀♀. Ovariumtransplantaten in (R)NC-♂♂ vertonen naast 5-daagse cyclische veranderingen ook langdurige perioden met grote, persisterende CL; normale (R)-♀♀ vertonen slechts 5-daagse cyclische ovariumactiviteit. Cyclische ovariumactiviteit houdt in NC-♂♂ na een gering aantal cycli op; de ovaria vertonen dan slechts follikelontwikkeling. Dit beeld is ook aanwezig in ovariumtransplantaten in AC-♂♂ (Goodman, 1934).

*exp.4 Het aantal follikels dat per cyclus ovuleert*

De ovariumcyclus van vrouwelijke ratten wordt, evenals die van de meeste vrouwelijke zoogdieren, gekenmerkt door de 'wet van de constante aantallen follikels' (Lipschütz, 1928). Deze wet houdt in, dat per cyclus een bij benadering constant aantal follikels ovuleert. Deze wet gaat ook op, als een gedeelte van het ovariumweefsel verwijderd is ('compensatoire ovulatie') of indien slechts getransplanteerd ovariumweefsel aanwezig is (Welschen, 1971).

Om te onderzoeken, of cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ eveneens gekenmerkt werd door een constant aantal per cyclus ovulerende follikels, werden in ovariumtransplantaten uit cyclische NC-♂♂ de aantallen pre- of postovulatoire follikels en/of CL, die volgens morfologische karakteristieken tot eenzelfde generatie behoorden, geteld. Zoals weergegeven in tabel 3 bleek dit aantal weliswaar constant maar hoger dan dat, algemeen bekend en waargenomen bij vrouwelijke ratten.

Om dit verschil nader te onderzoeken werd de grootte bepaald van het aantal follikels dat na ECS-POA bij TP-♀♀ of AC-♂♂ tot CL werd getransformeerd, en op grond daarvan geacht kon worden tot eenzelfde 'generatie' te behoren. Zoals weergegeven in tabel 3 bleek het aantal in TP-♀♀ niet verschillend van dat, gevonden bij normale vrouwelijke ratten; het aantal in AC-♂♂ was ook constant, doch gelijk aan dat eerder gevonden bij NC-♂♂.

Tabel 3 : Aantal follikels per generatie \* in ovariumweefsel in diverse typen mannelijke en vrouwelijke dieren.

	aantal dieren	aantal follikels per generatie	S.E.M.
<i>vrouwelijke ratten met in situ ovaria</i>			
normale (RU) - ♀♀	9	12.6	0.53
"geandroginiseerde" ** (RU) - ♀♀	13	12.7	0.50
(RU) - ♀♀ onder constante belichting	9	10.9	0.60
<i>vrouwelijke ratten met ovariumtransplantaten</i>			
neonataal geovariëcto- meerde (RU) - ♀♀	7	13.5	0.98
"geandroginiseerde" (RU) - ♀♀	9	13.7	0.83
<i>mannelijke ratten met ovariumtransplantaten.</i>			
(RU)NC - ♂♂	10	16.6	0.60
(R)NC - ♂♂	10	15.4	0.76
(RU)AC - ♂♂	18	17.4	0.45

\* aantal follikels per generatie = aantal follikels/CL per cyclus in spontaan ovulerende dieren.  
 \*\* 1250 µg TP op dag 5 = aantal CL, gevormd na ECS-POA in niet-spontaan ovulerende dieren.

Geconcludeerd wordt, dat in cyclische NC-♂♂ een constant aantal follikels per cyclus tot CL wordt getransformeerd; dit aantal is hoger dan het overeenkomstige aantal in normale vrouwelijke ratten. Uit dit gegeven en de aantallen follikels, die tegelijk tot CL kunnen worden getransformeerd in TP-♀♀ en AC-♂♂, wordt geconcludeerd dat het aantal in ovaria of ovariumtransplantaten rijpende follikels geslachtsverschillend is en niet afhankelijk van neonatale blootstelling aan testishormonen of TP.

*exp. 5 Een 'kritische periode' voor de afgifte van de ovulatoire hoeveelheid gonadotropine*

Aangezien bij vrouwelijke ratten de ovulatoire gonadotropine-afgifte uit de hypofyse op karakteristieke uren in de vroege namiddag van de dag van pro-oestrus plaatsvindt (gedurende de zgn. 'kritische uren' - Everett, 1961), werd onderzocht in hoeverre cyclische ovarium-activiteit in NC-♂♂ eveneens gekenmerkt werd door 'kritische uren' voor de afgifte van ovulatoire hormonen.

Daartoe werd allereerst, overeenkomstig een procedure beschreven door Everett & Quinn (1966) het effect onderzocht van verdoven van cyclische (RU)NC-♂♂ op verschillende tijdstippen van de namiddag van pro-oestrus met Nembutal (33 mg per kg lichaamsgewicht). Een ongestoord cyclusverloop na deze ingreep werd uitgelegd als teken, dat het verdoven geen invloed had gehad op de ovulatoire gonadotropine-afgifte. Het optreden van een extra dag met vaginale cornificatie werd uitgelegd als teken van uitstel van de ovulatoire gonadotropine-afgifte met 24 uur (overeenkomstig Everett & Sawyer, 1950). Zoals weergegeven in tabel 4 leidde verdoving om 13.00 uur in de meeste gevallen tot uitstel van ovulatie; verdoven om 17.00 uur had in de meeste gevallen geen effect op ovulatie.

In een tweede experiment werd van (RU)- en (R)NC-♂♂ de oöcyt-morfologie in preovulatoire resp. postovulatoire follikels onderzocht op verschillende tijdstippen van de dag van pro-oestrus en oestrus. Tsafiriri & Kraicer (1972) en Vermeiden & Zeilmaker (1973) beschreven histologische veranderingen in deze oöcyten, welke exact gecorreleerd konden worden met de afgifte resp. met het tijdstip van afgifte van de ovulatoire hoeveelheid gonadotropine. Zoals weergegeven in tabel 5

waren verschijnselen van oöcytrijping -i.c. metafase-II chromosomen-aanwezig in alle oöcyten op de oestrusdag, welke binnen en buiten de postovulatoire follikels werden aangetroffen (cf. fig. 5 k-n). Op de dag van pro-oestrus verschenen verschijnselen van oöcytrijping na 16.00 uur in de preovulatoire follikels.

Tabel 4 : Effect van injectie van nembutal\* op verschillende tijdstippen op de dag van pro-oestrus op de vaginale cyclus in cyclische NC-33

---

tijdstip van injectie met nembutal	13.00 uur	17.00 uur
vaginale cornificatie met 1 dag verlengd	8	3
geen verandering van de vaginale cyclus	1	8

---

\* 33 mg Na-pentobarbital per kg lichaamsgewicht;  
intraperitoneaal geïnjecteerd.

Geconcludeerd wordt uit deze experimenten, dat de afgifte van de ovulatoire hoeveelheid gonadotropine om 17.00 uur over het algemeen reeds heeft plaatsgehad, terwijl dit om 13.00 uur nog niet het geval is. Deze resultaten wijzen derhalve op het bestaan van, tenminste ongeveer, dezelfde 'kritische uren' op de namiddag van pro-oestrus in cyclische



Tabel 5 : Morfologie van oöcyten in ovariumtransplantaten in NC -33 op verschillende tijdstippen van de dag van pro-oestrus en oestrus.

---

	aantal dieren	oöcytmorfologie	
		nucleolus intact	nucleolus verdwenen
pro-oestrus 10 - 11 uur	7	7	0
pro-oestrus 13 - 15 uur	3	3	0
pro-oestrus 16 - 17½ uur	6	4	2
pro-oestrus 22½ uur	1	0	1
oestrus 10 - 23 uur	12	0	12**

---

\* : nucleolus aanwezig tot 2 à 4 uur na afgifte van ovulatoire gonadotropinen.

\*\* : alle 12 vertoonden het chromosomenpatroon van metafase-II, tenminste 8 uur na afgifte van ovulatoire gonadotropinen verschijnend.

NC-♂♂ als in normale vrouwelijke ratten voor de ovulatoire gonadotropine-afgifte uit de hypofyse.

*exp.6 Observaties van vrouwelijk bronstgedrag van cyclische NC-♂♂*

Een drietal aspecten van vrouwelijk bronstgedrag in NC-♂♂ werd bestudeerd:

- 6.1. Perioden in de ovariumcyclus, waarin vrouwelijk bronstgedrag verkregen kon worden.
- 6.2. Het vroegste tijdstip op de dag van pro-oestrus, waarop bronstgedrag verkregen kon worden en de duur van de periode, gedurende welke dit gedrag aangehouden kon worden.
- 6.3. Effecten van vrouwelijk bronstgedrag op de secretie van gonadotropine.

6.1. Bronstgedrag kan bij vrouwelijke ratten onder adequate hormonale omstandigheden geactiveerd worden. Long & Evans (1922) stelden vast, dat gedurende de cyclus de hormonale omstandigheden alleen gedurende de pro-oestrus- en vroege oestrusfase adequaat waren.

Om te onderzoeken op welke dagen van de cyclus van NC-♂♂ reacties van vrouwelijk bronstgedrag verkregen konden worden, werden deze dieren dagelijks gedurende twee weken (10 tests) tussen 17.00 en 19.00 uur bij intacte mannelijke ratten in observatiekooien geplaatst. Zowel (RU)NC-♂♂ met uitsluitend 5-daagse cycliciteit als (R)NC-♂♂, die de in experiment 2 beschreven langdurige perioden met vaginale mucificatie vertoonden, werden onderzocht.

De resultaten staan weergegeven in tabel 6: uit de waarnemingen blijkt, dat vrouwelijk bronstgedrag vrijwel uitsluitend werd waargenomen bij testen op de dag van pro-oestrus. Gedurende dergelijke testperioden vertoonden de NC-♂♂ alle bekende aspecten van vrouwelijk bronstgedrag zoals 'hopping', 'darting', 'ear-wiggling' en lordose. Op de andere dagen van de cyclus werden dergelijke gedragingen niet gezien; de intacte mannelijke ratten werden over het algemeen geweerd.

Geconcludeerd wordt, dat vrouwelijk bronstgedrag bij cyclische NC-♂♂ slechts op de dag van pro-oestrus kan worden geactiveerd.

Tabel 6 : Receptief gedrag bij cyclische NC-♂♂ bij onderzoek op verschillende dagen van de ovariële cyclus.

---

dag van de cyclus	12 (R)NC-♂♂	15 (RU)NC-♂♂	totaal
pro-oestrus	25 / 27*	33 / 35	58 / 62
oestrus	1 / 18	0 / 28	1 / 46
dioestrus-1	0 / 16	0 / 30	0 / 46
dioestrus-2	0 / 24	0 / 32	0 / 56
dioestrus-3	0 / 15	0 / 25	0 / 40
langdurige vaginale mucificatie	0 / 20	-----	0 / 20

---

\*  
aantal tests met receptief gedrag / totaal  
aantal tests

6.2 Bij 5-daags cyclische vrouwelijke ratten is het vroegste tijdstip op de dag van pro-oestrus, waarop reacties van bronstgedrag verkregen kunnen worden, ongeveer 14.00 uur (Schwartz, 1969; Rodgers, 1971).

Tabel 7 : Lordose-quotiënten van 7 NC-33 bij observaties in de namiddag van pro-oestrus.

observatietijd	Groep A *		Groep B *				
	rat nr.		rat nr.				
	906	933	741	750	907	930	932
16 uur							
	21	89	0	100	0	25	50
17 uur							
	100	100	100	100	60	70	83
18 uur							
	100	100	100	100	77	67	100
19 uur							
	100	100	100	100	100	90	100
20 uur							
	100	100	100	100	100	77	100
21 uur							
	100	100	100	100	100	63	100
22 uur							
	100	100	100	100	100	56	100
23 uur							
	100	100	100	100	94	13	100
24 uur							

\* Groep A. : 2 dieren werden gedurende 10 minuten per uur bij een intacte mannelijke rat geplaatst en hun gedragingen werden geregistreerd.

Groep B. : 5 dieren werden vanaf 16 u. voortdurend bij intacte mannelijke dieren geplaatst en 10 minuten per uur geobserveerd.

De duur van de periode in de pro-oestrus- en oestrus-fase, waarin dergelijke reacties verkregen kunnen worden, wordt geschat op 12 - 19 uur (Kuehn & Beach, 1963).

Om te onderzoeken, vanaf welk tijdstip en gedurende hoe lange periode vrouwelijk bronstgedrag bij cyclische NC-♂♂ geactiveerd kon worden werden 7 (RU)NC-♂♂ in de namiddag van pro-oestrus vanaf 16.00 uur ófwel gedurende 10 min. per uur bij intacte mannelijke dieren geplaatst en geobserveerd (2 dieren; tabel 7a) ófwel vanaf 16.00 uur voortdurend bij intacte mannelijke dieren gelaten en gedurende 10 min. per uur geobserveerd (5 dieren; tabel 7 b).

Bij de eerste observatie tussen 16.00 en 17.00 uur behaalden 2/7 dieren een LQ van 75 of meer; de overige 5 dieren vertoonden slechts in geringe mate of in het geheel geen bronstgedrag. In de loop van de volgende uren vertoonden echter alle dieren kenmerken van bronstgedrag en haalden voortdurend hoge LQ-scores. Aan het einde van de observatieperiode was slechts bij 1 de LQ-score weer aanmerkelijk gedaald.

Geconcludeerd wordt, dat de periode, waarin reacties van bronstgedrag verkregen kunnen worden op de dag van pro-oestrus bij cyclische (RU)NC-♂♂ omstreeks 16.00 uur een aanvang neemt. De duur van de periode waarin dergelijke reacties aanhielden, bedroeg tenminste 7 uur; de duur werd wellicht niet bekort door de voortdurende activiteiten van de intacte mannelijke ratten.

6.3 Als cyclische vrouwelijke ratten worden gedekt, dan wordt de 5-daagse cyclische ovariumactiviteit onderbroken doordat luteale activiteit optreedt (Long & Evans, 1922). Afferente prikkels van cervix en vagina, die via de *nervus pelvicus* het centrale zenuwstelsel bereiken, spelen bij het tot stand komen van luteale activiteit door de copulatiestimulus een beslissende rol (Kollar, 1953). Ook na doorsnijding van de *nervus pelvicus* zijn echter nog effecten van de copulatiestimulus op secretie van gonadotropine aantoonbaar (Spies et al. 1971; Spies & Niswender, 1971) alhoewel luteale activatie achterwege blijft.

Het dagelijks testen van 5-daagse cyclische (RU)NC-♂♂ op reacties van bronstgedrag, zoals in 6.1 beschreven, had geen invloed op het 5-daags cyclische patroon van ovarium-activiteit. De duur van blootstelling aan de activiteiten van intacte mannelijke dieren varieerde in de

boven (6.1 en 6.2) beschreven onderzoeken van 10 min. tot 8 uur of een hele nacht. Het aantal geobserveerde mounts door de intacte mannelijke ratten in de onder 6.2 beschreven proeven, bedroeg meer dan 200 !

Het dagelijks testen van (R)NC- $\delta\delta$  had echter wél invloed op het patroon van ovariumactiviteit van deze dieren. Zoals aangegeven in

*Tabel 8 : Langdurige perioden met vaginale mucificatie bij 12 (R)NC- $\delta\delta$  en dagelijks onderzoek van receptief gedrag*

---

	Vóór de onderzoek- periode	Ingaande gedu- rende de onder- zoekperiode	Na de onderzoek- periode
Aantal perioden met vag. mucif.	24	2	49
Aantal 5-daagse cycli	28	43	94
Ratio	1.2	21.5	1.9

---

tabel 8 vertoonden deze in de periode voorafgaand aan en volgend op de dagelijkse testen regelmatig de in exp. 2 genoemde, langdurige perioden met vaginale mucificatie; gedurende deze testen bleven dergelijke perioden echter achterwege en werd uitsluitend 5-daagse cycliciteit waargenomen.

Geconcludeerd wordt, dat reacties van bronstgedrag in 5-daags cyclische (RU)NC- $\delta\delta$  geen effect hebben op het patroon van ovariumactiviteit in deze dieren. Bij (R)NC- $\delta\delta$  lijken de reacties van

brongstgedrag het optreden van langdurige perioden met vaginale mucificatie te voorkomen.

*exp.7 Ovariumactiviteit in NC-♂♂ op verschillende tijdstippen na ovariumtransplantatie*

Zoals beschreven in *exp. 1, 2 en 3*, hield cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ na een beperkt aantal cycli op. De duur van deze periode bedroeg 2-4 maanden bij (RU)NC-♂♂ met uitsluitend 5-daagse cycliciteit, 3.5 - 14 maanden bij (R)NC-♂♂, die naast 5-daagse cycliciteit ook langdurige perioden met vaginale mucificatie vertoonden.

Om te onderzoeken of de transplantaat-conditie van het ovarium in NC-♂♂ verantwoordelijk was voor het vroegtijdig ophouden van cyclische ovariumactiviteit in deze dieren, werd de activiteit van soortgelijke transplantaten onderzocht in 7 neonataal geovariëctomeerde vrouwelijke (RU)-dieren.

Bij al deze 7 dieren traden in de loop van 7 maanden na ovarium-implantatie tenminste 35 cycli op; microscopisch onderzoek van de transplantaten na deze periode wees uit, dat de vaginale cycli van deze dieren inderdaad tot het moment van autopsie door cyclische ovariumactiviteit veroorzaakt werden. De gemiddelde grootte van één generatie CL in deze transplantaten bedroeg 13.5 (tabel 3).

Geconcludeerd wordt, dat het ophouden van cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ niet primair veroorzaakt wordt door aan de transplantaatconditie van het ovariumweefsel inherente factoren. Het ligt dan ook voor de hand dat het veroorzaakt wordt door een aan NC-♂♂ inherente factor.

*exp.8 Inductie van CL-vorming in anovulatoir geworden NC-♂♂*

Cyclische vrouwelijke ratten kunnen onder vele omstandigheden anovulatoir worden, zoals door ouderdom (Mandl, 1961; Aschheim, 1966), door een bijzondere genetische constitutie (Everett, 1940), door constante belichting (Dempsey & Searles, 1943; Bunn & Everett, 1957), of door

laesies in de hypothalamus (Greer, 1953). Dergelijke dieren kunnen ovuleren onder invloed van diverse stimuli zoals progesteron-behandeling, copulatie, ECS-POA en ECA-AME. Soms werd daarbij gevonden (Greer, 1953; Aschheim, 1966; Clemens et al., 1969) dat éénmalige inductie van ovulatie voldoende was om cyclische ovariumactiviteit voor tenminste enige tijd te herstellen.

Het effect van bovengenoemde stimuli op ovariumactiviteit in anovulatoir geworden NC-♂♂ werd in dit en het volgende experiment onderzocht.

Bij 6 (RU)NC-♂♂ werd ECS-POA toegepast; bij alle dieren was 4-7 dagen na de stimulus een generatie niet functionele CL in de ovariumtransplantaten aanwezig. Op grond van dagelijkse uitstrijken van het vagina-transplantaat en morfologie van deze CL werd geconcludeerd, dat deze CL door ECS-POA waren geïnduceerd. Het gemiddelde aantal CL bedroeg 12.5.

Bij 6 andere dieren werd ECS-AME toegepast; 5/6 vertoonden CL - vorming in de ovariumtransplantaten na deze stimulus.

Bij 14 (RU)NC-♂♂ werd een éénmalige injectie met 2.5 mg progesteron gegeven; bij afwezigheid van CL-vorming door deze stimulus - onderzocht aan de hand van dagelijkse vagina-uitstrijken en soms ook laparotomie - werd een tweede, soortgelijke injectie 10 dagen later gegeven. Uit het verloop van dagelijkse vagina-uitstrijken na de injectie en histologisch onderzoek van 5 ovaria, kon worden afgeleid dat bij in totaal 8 van de 14 dieren progesteron de vorming van CL tot gevolg had. Deze inductie van CL-vorming resulteerde bij alle 8 onderzochte dieren in een langdurige periode met vaginale mucificatie; dit duidde aan, zoals in hoofdstuk 5 besproken zal worden, dat de door injectie van progesteron geïnduceerde CL functioneel actief waren. Het gemiddelde aantal CL in 3 ovariumtransplantaten bedroeg 14. De door progesteron geïnduceerde CL-vorming werd bij de 5 overige dieren gevolgd door een korte periode met hernieuwde cyclische ovariumactiviteit,

Geconcludeerd wordt, dat anovulatoire NC-♂♂ CL-vorming kunnen vertonen onder invloed van stimuli, die in diverse typen anovulatoire, vrouwelijke ratten inductie van ovulatie tot gevolg hebben. Een eenmalige injectie van progesteron kan resulteren in de vorming van CL, die functioneel actief worden.



Enmalige inductie van CL-vorming in anovulatoire NC-♂♂ kan het optreden van hernieuwde cyclische ovariumactiviteit tot gevolg hebben.

*exp.9 Observaties van vrouwelijk bronstgedrag van anovulatoire NC-♂♂*

Vrouwelijke ratten, die anovulatoir geworden waren onder invloed van constante belichting, ovuleerden na copulatie (Dempsey & Searles, 1943). Indien de copulatie-stimulus beperkt werd, doordat de vagina werd afgedicht en mannelijke ratten na 10 'mounts' werden verwijderd, dan trad geen ovulatie op (Hardy, 1970).

Om te onderzoeken of vrouwelijk bronstgedrag bij anovulatoire NC-♂♂ geactiveerd kon worden, en of dergelijk bronstgedrag een effect had op de secretie van gonadotropine, werden 13 (RU)- en (R)NC-♂♂ (leeftijd 6-9 mnd) bij intacte ♂♂ geobserveerd. Er waren sinds het begin van de anovulatoire periode bij de NC-♂♂ 11 - 35 dagen verlopen. Alle dieren vertoonden vrouwelijk bronstgedrag; dit gedrag hield gedurende de gehele observatieperiode van 30 - 60 min. aan.

Bij 10 /13 dieren vertoonde de vagina-uitstrijk op de tweede dag na deze test een leukocytair beeld; daarna traden 5-daagse cyclische veranderingen op. Microscopisch onderzoek van 3 ovaria, 3 dagen na de test, toonden aan dat CL-vorming onder invloed van de 'copulatie-stimulus' had plaatsgevonden; in deze 3 ovariumtransplantaten waren gemiddeld 13 CL gevormd.

Om te onderzoeken, in hoeverre de 'copulatiestimulus' fungeerde als 'trigger' van een endogeen afgiftemechanisme van een ovulatoire hoeveelheid gonadotropine, dan wel de afgifte van een stimulus-afhankelijke dosis gonadotropine bewerkstelligde - in welk laatste geval de stimulus tenminste 30 minuten aanwezig zou moeten zijn (Everett & Sawyer, 1953; Vermeiden & Zeilmaker, 1973) - werden 6 anovulatoire (RU)-NC-♂♂ gedurende 3-5 minuten samen met intacte mannelijke ratten geobserveerd. Alle dieren vertoonden bronstgedrag; bij alle dieren trad CL-vorming en cyclische ovariumactiviteit op na deze test.

Geconcludeerd wordt, dat bronstgedrag bij anovulatoire NC-♂♂ in de eerste weken na het begin van de anovulatoire periode geactiveerd kan worden; blijkbaar zijn de door het 'polyfolliculaire' ovarium geproduceerde oestrogene hormonen voldoende om deze activering mogelijk te maken.

De 'copulatiestimulus' blijkt bij anovulatoire NC-♂♂ als trigger van een afgiftemechanisme van een ovulatoire hoeveelheid gonadotropine te kunnen fungeren.

Na eenmalig geïnduceerde CL-vorming kunnen anovulatoire NC-♂♂ weer cyclische ovariumactiviteit vertonen.

## DISCUSSIE

Een aantal aspecten van de boven beschreven experimenten zal in het volgende besproken worden aan de hand van de twee vragen, welke aan het einde van de inleiding van dit hoofdstuk werden geformuleerd. Een overzicht van de te bespreken punten is weergegeven in tabel 9.

### § 1 *Cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂*

Dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten in (RU)NC-♂♂ en (R)NC-♂♂ toonden aan, dat 5-daagse vaginale cycli in dergelijke dieren voorkwamen, resp. voor konden komen. Vijfdaagse vaginale cycli bleken te corresponderen met 5-daagse ovarium-cycli. Het behoort blijkbaar tot de mogelijkheden van het regulatiemechanisme van ovariumactiviteit in NC-♂♂ om cycli van voorspelbare regelmaat, in duur gelijk aan die van vrouwelijke stamgenoten, te onderhouden. Het is in dit verband wellicht interessant na te gaan of NC-♂♂ van een stam, waarvan de vrouwelijke dieren over het algemeen 4-daagse cycli vertonen, eveneens 4-daags cyclisch zijn.

(R)NC-♂♂ vertoonden naast 5-daagse cycliciteit echter ook langdurige perioden met vaginale mucificatie en persisterende CL in de ovariumtransplantaten. In hoofdstuk 5 te bespreken experimenten wezen uit, dat de persisterende CL gedurende dergelijke perioden functioneel actief waren, dat wil zeggen, zodanige hoeveelheden progesteron produceerden, dat ovulatie en 5-daagse cycliciteit verhinderd werden.

Tabel 9 : *Overzicht van de onderwerpen, die in de discussie bij hoofdstuk 4 aan de orde worden gesteld.*

5	experi- menten	NC-♂♂ vergelijkbaar met normale ♀♀ ††	NC-♂♂ verschil- lend van ♀♀ ††	bepalende factor van het verschil
1	1,2,3	5-daags cyclische ovariumactiviteit in (RU)NC-♂♂ en (R)NC-♂♂	langdurige perio- den met vaginale mucificatie en persisterende CL in (R)NC-♂♂	perinatale testishor- monen ?
2	4		een groter aantal follikels wordt per cyclus tot CL getransformeerd	prenatale testis hormonen ?
3	5,6	'kritische uren' voor de afgifte van ovulatoire gonado- tropine ; begin en duur van cyclische 'bronsst'; effect van bronsstgedrag op se- cretie van gonado- tropine		
4	7		ophouden van cy- clische ovulatie relatief kort na ovariumimplantatie	perinatale testishor- monen.
5	8,9	CL-vorming in ano- vulatoire NC-♂♂ na ECS-POA, ECS-AME, progesteron-injectie en bronsstgedrag. Cyclische ovarium- activiteit na een- malig geïnduceerde CL-vorming	luteale activatie na inductie van CL-vorming met progesteron	?

Vrouwelijke (R)-ratten vertoonden op een leeftijd van 3-6 maanden 5-daagse cycliciteit; op een leeftijd van 12-18 maanden vertoonden ze echter behalve vijfdaagse cycliciteit ook perioden met spontane luteale activiteit. Het leek er derhalve op dat (R)NC-♂♂ een patroon van ovariumactiviteit vertoonden, dat nauwe overeenkomst vertoonde met oude (R)-♀♀, meer dan met jong-volwassen (R)-♀♀. Op deze overeenkomst met oudere vrouwelijke dieren zal in hoofdstuk 5 nader worden ingegaan. Daar zal het mogelijk verband met perinatale testishormonen in NC-♂♂ nader worden toegelicht.

Opvallend is, dat de twee, van moederszijde nauw verwante groepen NC-♂♂ een kwalitatief verschillend patroon van ovariumactiviteit vertoonden. De gegevens van Yazaki (1960), Harris (1964) en Ladovsky et al. (1969) wijzen erop, dat de door hen bestudeerde NC-♂♂ slechts korte cycli zonder luteale activiteit vertoonden. Daarentegen wijzen gegevens van Henzl et al. (1971) - namelijk de door hen beschreven ovariummorfologie en de hoge bloedconcentratie van progesteron - erop, dat spontane luteale activering bij hun NC-♂♂ eveneens voorkwam. Het lijkt er derhalve op, dat cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ met betrekking tot luteale activiteit kan verschillen van die van normale vrouwelijke ratten.

## § 2 Een grotere 'generatie' follikels in ovariumtransplantaten in NC-♂♂

Telling van het aantal follikels, dat in ovariumtransplantaten in NC-♂♂ per cyclus tot CL werd getransformeerd, wees uit dat dit aantal constant was. Het was echter significant hoger dan dat, wat algemeen bekend bij vrouwelijke ratten wordt waargenomen. Nader onderzoek van de grootte van een 'generatie' follikels in vrouwelijke ratten onder verschillende reproductieve omstandigheden wees uit, dat dit aantal voortdurend gelijk bleef aan dat van normale vrouwelijke ratten. Daarentegen bleek de grootte van een generatie follikels in ovariumtransplantaten in NC-♂♂ gelijk aan die in AC-♂♂. Geconcludeerd werd, dat de grootte van een generatie follikels in ovariumweefsel bij vrouwelijke of mannelijke dieren geslachtsverschillend is, en niet beïnvloed wordt door de aanwezigheid van neonatale testishormonen of substitutie daarvan met TP. Een gelijklopende conclusie werd bereikt ten aanzien van hypofysegehalten (Gans & De Jongh, 1963; Johnson, 1971) en bloedspiegels (Johnson, 1972) van FSH uit onderzoek

van mannelijke en vrouwelijke dieren onder verschillende reproductieve omstandigheden. Het lijkt verantwoord om een nauwe relatie te veronderstellen tussen de bloedspiegels van FSH en de aantallen rijpende follikels in ovariumweefsel (Greenwald, 1962; Welschen, 1972).

Regulatie van follikelrijping wordt toegeschreven aan de werking van het 'tonic system' voor regulatie van ovariumactiviteit, dat namelijk alle aspecten, behalve cyclische ovulatie regelt (Barraclough, 1966). Voornoemde waarnemingen zouden aanduiden, dat dit 'tonic system' eveneens geslachtsverschillende kenmerken vertoont. Anders echter dan die van het 'cyclic system', dat cyclische ovulatie regelt, ontwikkelen zich deze geslachtsverschillen in het 'tonic system' niet in de perinatale periode onder invloed van de aanwezigheid van testishormonen (cf. Johnson, 1972).

Het is op basis van bovengenoemde gegevens slechts in beperkte mate mogelijk om aan te duiden gedurende welke ontwikkelingsfase en onder invloed van welke factoren een geslachtsverschil in het 'tonic system' voor regulatie van ovariumactiviteit tot stand kan komen. Dat een genetisch verschil aan de basis ligt, zoals werd gesuggereerd door Gans & De Jongh (1963), lijkt vanzelfsprekend; het probleem is echter, hoe dit genetisch verschil in de loop van de ontwikkeling tot expressie komt.

Aangezien diverse ingrepen in de neonatale (TP-behandeling, castratie, ovariëctomie) of volwassen (constante belichting) periode het bovengenoemde geslachtsverschil niet deden verdwijnen, ligt het voor de hand te veronderstellen dat het reeds bij de geboorte aanwezig is en zich derhalve in de prenatale fase ontwikkelt.

Aangaande het substraat van deze geslachtsverschillende ontwikkeling kan met name gesteld worden, dat het op grond van bovengenoemde experimenten niet mogelijk is om uit te maken, of dit in het CZS dan wel in de hypofyse gezocht dient te worden.

### § 3 Een 'kritische periode' bij NC-38 op de dag van pro-oestrus

Het bestuderen van afgifte van een ovulatoire hoeveelheid gonadotropine in dieren met alleen getransplanteerd ovariumweefsel, is niet eenvoudig, omdat het bestudeerd eindpunt, ovulatie d.w.z. follikelsprong, in ovariumtransplantaten dikwijls niet voorkomt. Ook na in-

jecteren van grote hoeveelheden gonadotrope hormonen blijven oöcyten in ovulatoire follikels achter. Er zijn aanwijzingen dat het niet optreden van ovulatie in ovariumtransplantaten niet primair veroorzaakt wordt door deficiënte stimulatie door gonadotropine maar door lokale, aan de transplantaatconditie van het ovarium eigen, factoren (Welschen, 1971). Het lijkt aldus gerechtvaardigd om de door ons gebruikte ,indirecte criteria voor vaststellen van afgifte van ovulatoire gonadotropine - namelijk dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten en oöcytrijping - te handhaven.

De waarnemingen van exp.5 toonden aan, dat in cyclische NC-♂♂ tenminste ongeveer dezelfde 'kritische uren' gelden voor de afgifte van ovulatoire gonadotropinen als in normale vrouwelijke ratten (Everett, Sawyer & Markee, 1949). De waarnemingen van het begin van de periode, waarin vrouwelijk bronstgedrag verkregen kon worden, doen vermoeden dat dit vroegste tijdstip later ligt dan dat bij normale 5-daagse cyclische vrouwelijke ratten (Schwartz, 1969); het is echter vroeger dan dat voor 4-daagse cyclische vrouwelijke ratten (Rodgers, 1970).

Een redelijke schatting van de duur van de cyclische bronstperiode was op basis van de verkregen uitkomsten niet mogelijk; de verkregen minimale duur van 8 uur is nog ver verwijderd van de schattingen van de totale duur van 12-19 uur, welke door diverse auteurs voor normale vrouwelijke ratten zijn gemaakt (Blandau et al., 1941; Kuehn & Beach, 1963; Eckstein & Zuckerman, 1965).

Bij (RU)NC-♂♂ leidde vrouwelijk bronstgedrag, hoe lang ook aangehouden, niet tot onderbreking van 5-daags cyclische ovariumactiviteit. Aangezien mechanismen voor activatie van CL in NC-♂♂ aanwezig zijn, zoals in hoofdstuk 5 besproken zal worden, moet worden aangenomen dat dergelijke mechanismen door dit bronstgedrag niet worden geactiveerd. Luteale activatie onder invloed van bronstgedrag bij normale vrouwelijke ratten treedt niet op, als *de nervus pelvicus*, die de voor luteale activatie belangrijke afferente zenuwen bevat, bilateraal wordt doorgesneden (Kollar, 1953). Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat het uitblijven van luteale activatie onder invloed van bronstgedrag van NC-♂♂ samenhangt met het ontbreken van een *in situ* cervix en vagina bij deze dieren, waardoor stimulatie van *de nervus pelvicus* niet optreedt bij bronstgedragingen.

Bij (R)NC- $\delta\delta$  had dagelijks testen van bronstgedrag tot gevolg dat de langdurige perioden van vaginale mucificatie en persisterende CL in de ovariumtransplantaten uitbleven. Het leek er derhalve op, dat luteale activatie, waarmee bovengenoemde verschijnselen samenhangen, door dit gedrag werd voorkomen. Spies & Niswender (1971) beschreven, dat bronstgedrag bij cyclische vrouwelijke ratten na bilaterale doorsnijding van de *nervus pelvicus*, weliswaar geen afgifte van prolactine -en daardoor luteale activatie - veroorzaakte, maar wel gevolgd werd door afgifte van FSH en LH. Het zou derhalve kunnen betekenen dat luteale activatie bij (R)NC- $\delta\delta$  samenhangt met specifieke afgiftepatronen van FSH en LH bij de inductie van ovulatie en CL-vorming, zoals in hoofdstuk 5 besproken zal worden.

#### § 4 *Vroegtijdig ophouden van cyclische ovariumactiviteit in NC- $\delta\delta$*

Het relatief vroeg ophouden van cyclische ovariumactiviteit in NC- $\delta\delta$  werd eerder eveneens beschreven door Yazaki (1960) en Harris (1964). Uit de morfologie van ovariumtransplantaten welke op verschillende tijden na transplantatie uit NC- $\delta\delta$  waren verwijderd, concludeerde Cambell (1966) eveneens dat een dergelijk proces op moest treden. Schindler & Wagner (1969) beschreven zeer langdurige cyclische ovariumactiviteit in NC- $\delta\delta$  met ovariumtransplantaten, doch gaven geen ovariummorfologische details.

Ophouden van cyclische ovariumactiviteit in vrouwelijke ratten kan op verscheidene manieren bewerkstelligd worden: door constante belichting (Browman, 1937), laesies vóór in de hypothalamus (Hillarp, 1949) of neonatale behandeling met een lage dosis TP (Swanson & van der Werff Ten Bosch, 1964). Cyclische ovulatie houdt op in de seniele levensfase van vrouwelijke ratten (Mandl, 1961; Aschheim, 1964) somtijds echter al op een leeftijd van  $\pm$  150 dg. (Everett, 1939). In dieren met alleen getransplanteerd ovariumweefsel kan cyclische ovulatie ophouden tengevolge van een slechte conditie van het transplantaat (Everett, 1961; Anderson et al., 1963). In onze experimenten met NC- $\delta\delta$  leek een slechte toestand van het getransplanteerde ovariumweefsel als directe aanleiding voor het ophouden van cyclische ovariumactiviteit onaanneemelijk, aangezien cyclische ovariumactiviteit in neonataal geovariëctomeerde vrouwelijke ratten gedurende een veel groter aantal cycli aanhield. Bovendien hield cyclische ovariumactiviteit in (R)NC- $\delta\delta$  tot meer dan een jaar aan, ondanks het gering aantal cycli. De leeftijd

van de NC- $\delta\delta$  leek niet de beperkende factor. Terwijl alle (RU)NC- $\delta\delta$  waarin ovariumtransplantatie op een leeftijd van 30-60 dagen had plaatsgevonden opgehouden hadden met cyclische ovariumactiviteit op een leeftijd van 170 dagen, kon implantatie van een ovarium op latere leeftijd nog gevolgd worden door een cyclische ovariumactiviteit (hoofdstuk 7). Vergelijking van de ovariumactiviteit met die van neonataal met een lage dosis TP behandelde vrouwelijke ratten (Swanson & van der Werff ten Bosch, 1964a) doet vermoeden, dat het vroegtijdig ophouden van cyclische ovariumactiviteit in neonataal gecastreerde mannelijke ratten wellicht verband houdt met de in de algemene inleiding genoemde perinatale blootstelling van deze dieren aan testishormonen. Er is een frappante overeenkomst in de duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit in de (RU)NC- $\delta\delta$  en die in vrouwelijke ratten, welke op dag 5 een injectie met 10  $\mu\text{g}$  TP hadden gehad (Gorski, 1969). Wellicht zou gesteld kunnen worden, dat de perinatale testishormonen in NC- $\delta\delta$  een effect hebben op het ovulatiemechanisme, dat ongeveer equivalent is met dat van 10  $\mu\text{g}$  TP op dag 5 aan vrouwelijke ratten.

#### *§ 5 Cyclische ovariumactiviteit in anovulatoir geworden NC- $\delta\delta$*

Het bleek mogelijk met diverse stimulede afgifte van een ovulatoire hoeveelheid gonadotropine in anovulatoir geworden NC- $\delta\delta$  tot stand te brengen. De aldus experimenteel tot stand gebrachte eerste ovulatie werd in een aantal gevallen gevolgd door hernieuwde spontane, cyclische ovariumactiviteit. Deze resultaten bevestigen het in de vorige paragraaf beschreven vermoeden, dat de conditie van het ovariumtransplantaat zelf niet de primaire factor was, die verantwoordelijk was voor het ophouden van cyclische ovariumactiviteit.

Een opmerkelijk verschijnsel was, dat CL, geïnduceerd door een eenmalige injectie met progesteron, functionele activiteit vertoonden. Injectie van progesteron in anovulatoire vrouwelijke ratten - waarin anovulatie werd veroorzaakt door hypothalamuslaesies (Greer, 1953) of een stamkenmerk was (Everett, 1940) - had wel ovulatie maar geen luteale activatie tot gevolg.



Injectie van progesteron gedurende de ochtend van pro-oestrus in cyclische vrouwelijke ratten kan weliswaar de afgifte van ovulatoire gonadotropine induceren (Zeilmaker, 1966), maar heeft eveneens geen luteale activatie tot gevolg (Rothchild & Schubert, 1963).

Daarentegen kan luteale activatie door progesteron in cyclische vrouwelijke ratten wel verkregen worden, indien de injectie wordt gegeven op de dag van oestrus (Rothchild & Schubert, 1963). Aangaande het mechanisme van luteale activatie door progesteron in het laatste geval maakte Everett (1963) waarschijnlijk, dat progesteron zelf wellicht niet het actieve agens was, maar exteroceptieve stimuli, waarvoor de ratten onder invloed van progesteron extra gevoelig waren geworden. Een verandering van gevoeligheid werd met name verondersteld voor mechanische stimulatie van cervix en vagina.

In eerdere experimenten (exp.6) bleek duidelijk dat stimulatie van het genitale gebied, zoals wellicht gebeurde tijdens 'copulatie' van bronstige NC-♂♂ met intacte ♂♂, geen luteale activatie veroorzaakte. Verder werd inductie van ovulatie en CL-vorming in anovulatoire NC-♂♂ op andere wijze dan door injectie met progesteron niet gevolgd door luteale activatie.

Het lijkt dan ook aannemelijk, dat luteale activatie na inductie van ovulatie met progesteron een specifiek effect van progesteron is, dat niet door verhoogde gevoeligheid voor exteroceptieve stimuli veroorzaakt wordt. Dit experiment ondersteunt dan ook veeleer de veronderstelling, dat progesteron een bevorderende werking heeft op de afgifte van prolactine (Alloiteau, 1962; Zeilmaker, 1965; Everett, 1968), dat op zijn beurt verantwoordelijk is voor initiatie van luteale activiteit.

Een opmerkelijk resultaat van experiment 9 was, dat de 'copulatiestimulus' bij anovulatoire NC-♂♂ als trigger kon fungeren van de afgifte van een ovulatoire hoeveelheid gonadotropine. Aangezien, zoals in experiment 6 werd geconcludeerd, 'copulatie' van NC-♂♂ niet gepaard gaat met specifieke genitale stimulatie, lijkt waarschijnlijk dat 'sexual excitement' (Brooks, 1937) in dit geval een voldoende stimulus is voor inductie van ovulatie. Deze veronderstelling wordt ondersteund door de eerder vermelde waarnemingen van Spies & Niswender (1971) dat cyclische vrouwelijke ratten na doorsnijding

van de *nervus pelvicus* weliswaar niet pseudozwanger worden na copulatie, maar wel verhoogde afgifte van FSH en LH vertonen.

Cyclische vrouwelijke ratten kunnen eveneens reflectorisch ovuleren onder invloed van de copulatiestimulus (Everett, 1952); anovulatoire vrouwelijke ratten ook, voor zover de anovulatoire conditie het gevolg is van constante belichting (Dempsey & Searles, 1943), of van neonatale behandeling met een kleine dosis TP (Segal & Johnson, 1959; Ericsson & Baker, 1966). Het heeft er echter de schijn van dat ovulatie onder invloed van copulatiestimuli bij deze ratten niet zo onmiddellijk gebeurt als bij de onderzochte (RU)NC-♂♂ (Swanson & van der Werff ten Bosch, 1964; Everett, 1967; Zarrow & Clark, 1968; Kalra & Sawyer, 1970; Hardy, 1970). Het is dan ook niet uitgesloten, dat verschillende mechanismen aan ovulatie na 'copulatie' bij NC-♂♂ en vrouwelijke ratten ten grondslag liggen.

#### SAMENVATTING

1. NC-♂♂ kunnen 5-daags cyclische ovariumactiviteit vertonen, vergelijkbaar met die in vrouwelijke ratten. Op de dag van pro-oestrus is er een 'kritische periode' voor de afgifte van ovulatoire gonadotropine; deze periode beslaat ongeveer dezelfde uren als die in vrouwelijke ratten.
2. NC-♂♂ van de (R)stam vertonen naast 5-daags cyclische ovariumactiviteit ook langdurige perioden met luteale activiteit. In dit opzicht vertoont ovariumactiviteit in (R)NC-♂♂ een nauwere overeenkomst met die in seniele (R)-♀♀ dan met die in jong-volwassen (R)-♀♀.
3. Gedurende iedere cyclus wordt bij NC-♂♂ een groter aantal follikels tot CL getransformeerd dan bij vrouwelijke dieren. Het aantal, tot eenzelfde 'generatie' behorende follikels in ovariumweefsel blijkt geslachtsverschillend. De bepalende factor van dit geslachtsverschil ligt wellicht in de prenatale levensfase.

4. Cyclische ovariumactiviteit houdt in NC-♂♂ na een beperkt aantal cycli op. In ovariumweefsel in anovulatoire NC-♂♂ kan hernieuwde cyclische ovariumactiviteit worden verkregen door diverse experimentele ingrepen.
5. De verschillen in ovariumactiviteit van NC-♂♂ en normale vrouwelijke ratten, genoemd onder 2 en 4, houden wellicht verband met de perinatale blootstelling van NC-♂♂ aan testishormonen; onder invloed van deze hormonen is het ovulatiemechanisme wellicht gefixeerd geraakt in een toestand tussen die van normale mannelijke en vrouwelijke ratten.

## HOOFDSTUK 5 : REGULATIE VAN LUTEALE ACTIVITEIT IN NC-♂♂

### INLEIDING

De CL van 5-daags cyclische, vrouwelijke ratten zijn 'niet - functioneel' dat wil zeggen : zij produceren niet voldoende progesteron om ovulatie tegen te gaan en de vorming van deciduaweefsel mogelijk te maken (Everett, 1961). Functionele activiteit van CL kan worden waargenomen tijdens zwangerschap.

Er zijn echter meer omstandigheden bekend, waaronder CL in vrouwelijke ratten functionele activiteit vertonen. Dergelijke perioden met luteale activiteit worden 'pseudozwangerschap' genoemd (Long & Evans, 1922). Pseudozwangerschap kan onder invloed van verscheidene stimuli verkregen worden. De oudste, als zodanig bekende stimuli waren de copulatiestimulus, mechanische stimulatie van cervix en vagina, en de zoogstimulus (Long & Evans, 1922). Andere stimuli, welke eveneens pseudozwangerschap induceerden, waren: elektrische stimulatie van cervix en vagina (Shelesnyak, 1931); de aanwezigheid van prolactine secretinerend ectopisch hypofyseweefsel, gedurende tenminste de eerste dagen na ovulatie (Alloiteau, 1958); reserpine-injectie op dag 4,0 of 1 van de cyclus in 5-daags cyclische vrouwelijke ratten (Barraclough & Sawyer, 1959); elektrische stimulatie van de ventromediale of dor-

somediale hypothalamus van vrouwelijke ratten (Everett & Quinn, 1966) en andere.

Opvallend in al deze experimenten was, dat de duur van de pseudozwangerschap vrijwel onafhankelijk was van de wijze, waarop deze werd geïnduceerd, en voortdurend 13-15 dagen bedroeg.

De duur van perioden van pseudozwangerschap kon evenwel verlengd worden door uterusextirpatie, inductie van deciduoomvorming in de uterus of verlenging van lactatie. Onder die omstandigheden had de pseudozwangerschap een lengte van 18 tot maximaal 26 dagen (Anderson et al., 1969; Bruce, 1958; Takahashi & Suzuki, 1971).

Het effect van een aantal van bovengenoemde stimuli voor inductie van luteale activiteit werd door Zeilmaker (1962; 1963; 1964) en Zeilmaker et al. (1967) onderzocht bij AC-♂♂ en TP-♀♀.

De onderzoeken toonden aan, dat injectie van reserpine activatie van kunstmatig geïnduceerde CL tot gevolg had. De activering hield aan zolang als reserpine werd ingespoten; injectie van reserpine had nooit de initiatie van een periode van constante duur met luteale activiteit tot gevolg. CL-activatie werd eveneens waargenomen onder invloed van door ectopisch hypofyseweefsel geproduceerd prolactine; de luteale activiteit leek bij voortdurende aanwezigheid van hypofyseweefsel gedurende onbepaalde tijd aan te houden. Verwijderen van de ectopische hypofyse had onmiddellijk ophouden van luteale activiteit in AC-♂♂ tot gevolg; het effect van deze ingreep bij TP-♀♀ was moeilijk te interpreteren.

Mechanische stimulatie van cervix en vagina van TP-♀♀ had geen inductie van luteale activiteit tot gevolg, alhoewel de dieren tijdens het stimuleren wél duidelijke reacties in gedrag (i.c. lordose) vertoonden (Zeilmaker, 1964).

Elektrische stimulatie van de ventromediale hypothalamus van TP-♀♀ leidde niet tot activatie van kunstmatig geïnduceerde CL (Zeilmaker et al., 1967).

Deze resultaten deden vermoeden, (1) dat een aantal aspecten van regulatie van luteale activiteit geslachtsverschillend georganiseerd waren, (2) dat een 'vrouwelijk' type zich ontwikkelde bij afwezigheid van neonatale testisfunctie of substitutie hiervan en een 'mannelijk' type bij aanwezigheid van een dezer factoren en (3) dat neonatale dif-

ferentiatie met betrekking tot ovulatie in nauw verband stond met neonatale differentiatie met betrekking tot regulatie van luteale activiteit.

Deze veronderstelling werd ondersteund door recente experimenten van Neill (1972). Deze auteur beschreef een 'surge mechanism' van secretie van prolactine, welk hormoon bij ratten het luteotrope hormoon bij uitstek is. Dit mechanisme kon in geovariëctomeerde vrouwelijke ratten geactiveerd worden door exogeen geïnjecteerd OB. Een dergelijk 'surge mechanism' kon op gelijke wijze geactiveerd worden in NC-♂♂ ; daarentegen kon het niet worden geactiveerd in geovariëctomeerde TP-♀♀ en in AC-♂♂.

Aldus kan voor de ontwikkeling van regulatiemechanismen van luteale activiteit in de neonatale periode een soortgelijk schema worden opgesteld als weergegeven in fig. 1 voor het ovulatiemechanisme.

Een impliciete aanname in een dergelijk schema is, dat NC-♂♂ van de geslachtsverschillende aspecten van luteale activiteit het 'vrouwelijk' type zouden vertonen onder de juiste experimentele omstandigheden.

Om de validiteit van deze aanname te onderzoeken, werd getracht om kenmerken van regulatie van luteale activiteit in NC-♂♂ te definiëren.

#### MATERIAAL EN METHODEN

De proefdieren en hun omstandigheden, alsmede de uitvoering van neonatale castratie en implantatie van ovarium- en vaginaweefsel, waren hetzelfde als beschreven in hoofdstuk 4.

#### *Ectopische implantatie van hypofyseweefsel en verwijdering van het ectopisch hypofysetransplantaat.*

De gehele hypofyse van een volwassen mannelijke of vrouwelijke donor werd onder het nierkapsel gebracht. Bij AC-♂♂ werd de ectopische hypofyse tegelijkertijd met het ovariumtransplantaat inge-

bracht. Bij NC-88 werd de operatie uitgevoerd, als dagelijkse vagina-uitstrijken hadden aangetoond, dat de dieren spontaan cyclische ovariumactiviteit vertoonden.

Het hypofysetransplantaat werd verwijderd door het met een iridectomieschaartje los te knippen van het omringende nierkapsel en vervolgens met een pincet te verwijderen. Bloeding van het onderliggende nierweefsel trad bij een dergelijke operatie nauwelijks op: blijkbaar had de getransplanteerde hypofyse weinig vasculaire verbindingen met dit nierweefsel. Daarentegen waren in het nierkapsel altijd relatief grote bloedvaten zichtbaar, die de bloedvoorziening van de getransplanteerde hypofyse verzorgden.

Bij autopsie werd onderzocht, of het transplantaat volledig was verwijderd; daartoe werd het nierweefsel onderzocht op eventuele resten onder een binoculair-microscoop.

#### *Elektrische stimulatie van de ventromediale hypothalamus (ES-VMN)*

Een bipolaire, concentrische elektrode werd met behulp van een stereotactisch instrument zodanig in de hersenen geplaatst, dat de punt zich in de ventromediale hypothalamus bevond. De gebruikte coördinaten volgens het systeem van De Groot (1959) waren:

voor-achter : + 6.0 mm  
 onder-boven : schedelbasis + 0.5 mm  
 links-rechts : 0.3 mm.

Bij autopsie werd de lokalisatie van de elektrode onderzocht aan de hand van microscopische preparaten van de hypothalamus.

De stimulus bestond uit rechthoekige, bifasische pulsen, afkomstig uit een speciaal voor dit doel vervaardigd instrument. De pulskarakteristieken waren dezelfde (100/sec; 1 msec/puls; 30 sec aan - 30 sec uit gedurende 30 min; 100  $\mu$ A pulshoogte), als eerder effectief bleken om bij vrouwelijke ratten pseudozwangerschap te induceren (Everett & Quinn, 1966; pers. waarn.).

### *Criteria voor luteale activiteit*

De volgende kenmerken werden karakteristiek geacht voor luteale activiteit:

#### *Mucificatie van uitstrijk en epitheel van getransplanteerd vagina-weefsel*

De veranderingen in getransplanteerd vagina-weefsel gedurende de 5-daagse cyclus zonder luteale activiteit werden in hoofdstuk 4 beschreven. Het optreden van mucificatie kan duiden op de aanwezigheid van progesteron, geproduceerd door de functionele CL (Barker & Walker, 1966).

#### *Mucificatie van getransplanteerd vagina-weefsel na 3 dagelijkse injecties van 25 µg OB*

Als OB wordt geïnjecteerd zal vagina-weefsel gaan prolifereren en cornificeren; bij aanwezigheid van progesteron wordt het cornificerende effect verhinderd en treedt uitgebreide mucificatie op. Deze test voor luteale activiteit werd door verscheidene auteurs in diverse experimentele omstandigheden toegepast (Astwood, 1941; Everett, 1956; Zeilmaker, 1964; Rothchild, 1965).

#### *Aanwezigheid van grote, eosinofiele CL in ovariumtransplantaten bij afwezigheid van morfologische tekenen van 5-daagse cyclische ovariumactiviteit.*

De veranderingen in ovariumtransplantaten gedurende de 5-daagse cyclus met niet-functionele CL werden eerder beschreven. Uitgangspunt voor dit criterium van luteale activiteit zijn de waarnemingen, verricht aan niet-functionele en functionele CL door Long & Evans (1922).

#### *Deciduumvorming in getransplanteerd uterusweefsel.*

De vorming van deciduomen wordt algemeen gebruikt als meest specifieke indicator van luteale activiteit. In oriënterende experimenten werd getracht deciduumvorming te verkrijgen in getransplanteerd uterusweefsel in vrouwelijke dieren. De resultaten waren echter niet eenduidig. Derhalve leek het niet mogelijk deciduumvorming in getransplanteerd uterusweefsel te gebruiken als kenmerk van luteale activiteit in mannelijke dieren.

*Duur van een fase met luteale activiteit*

De duur van een fase met luteale activiteit werd berekend door telling van het aantal dagen vanaf dioestrus-1 (= dag 1) tot en met de eerstvolgende dag met geheel of gedeeltelijk gecornificeerde uitstrijk, gevolgd door een uitstrijk met leukocyten.

## RESULTATEN

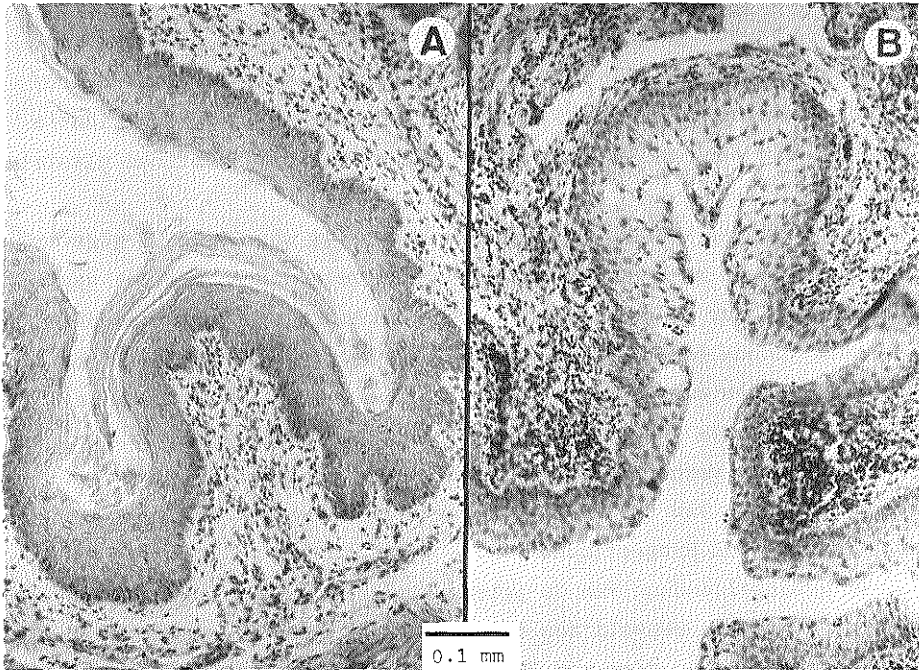
*exp.1 Spontane luteale activiteit in (R)NC- $\delta\delta$* 

Onderzoek van dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten van alle (in totaal 80) onderzochte cyclische (R)NC- $\delta\delta$  wees uit, dat naast 5-daagse cycli ook intervallen met vaginale mucificatie voorkwamen tussen opvolgende ovulaties. Bij sommige dieren kwamen dergelijke intervallen slechts incidenteel voor, bij andere dieren werden slechts incidenteel 5-daagse cycli waargenomen.

De microscopische morfologie van vagin-epitheel gedurende perioden met vaginale mucificatie werd bestudeerd bij 10 dieren. Het microscopisch aspect was als dat van vrouwelijke ratten tijdens lactatie-pseudozwangerschap (Long & Evans, 1922): enkele basale lagen met cuboidale cellen met daarop een laag muceuze cellen (fig.6). De ovariumtransplantaten van dezelfde dieren vertoonden een generatie van 13-18 grote, eosinofiele CL; de diameter van deze CL was groter (tot 1,5 mm) dan die van CL tijdens de 5-daagse cyclus (tot 1.0 mm). Naast deze grote CL waren meestal restanten van CL van oudere generaties zichtbaar. Tekenen van recente of op handen zijnde ovulatie werden nimmer waargenomen. De periode met vaginale mucificatie werd beëindigd met het verschijnen van kernhoudende en/of verhoorde epitheelcellen in de uitstrijk, gevolgd door een leukocyttaire uitstrijk (tabel 2).

Acht ovaria, die verwijderd waren op dagen, dat de vagina-uitstrijk kernhoudende en/of verhoorde epitheelcellen bevatte, bleken alle óf preovulatoire óf ovulatoire follikels te bevatten alsmede tekenen van luteolyse in de grote, eosinofiele CL. Drie ovaria, welke





*Figuur 8 a,b : Getransplanteerd vagina-weefsel in (R)NC-33 gedurende langdurige perioden met gemucificeerde vagina-uitstrijk en na voorbehandeling met 3 x 25 µg OB.*

8,a De injecties met OB werden gegeven vanaf de 16e dag met gemucificeerde uitstrijk na de laatstwaargenomen ovulatie. Het onder invloed van OB geprolifereerde vagina-epitheel is volledig verhoornd; dit duidt erop, dat de in het ovarium aanwezige CL slechts weinig progesteron produceren.

8,b De injecties met OB werden gegeven vanaf de 8e dag met gemucificeerde uitstrijk na de laatstwaargenomen ovulatie. Het onder invloed van OB geprolifereerde vagina-epitheel (vergelijk de toestand van onbehandelde dieren zoals weergegeven in figuur 6) blijft gemucificeerd; dit duidt op progesteronproductie door de in het ovarium aanwezige CL.

waren verwijderd op de onmiddellijk volgende dag met leukocytaire uitstrijk, vertoonden basofiele CL als op dag 1 van de 5-daagse cyclus. Het leek waarschijnlijk, dat uitstrijken met kernhoudende en/of verhoornde epitheelcellen na een periode met vaginale mucificatie aangaven, dat een nieuwe ovulatie op handen was, of juist had plaatsgevonden.

Aan 4 dieren werden 3 dagelijkse injecties met 25  $\mu$ g OB gegeven vanaf 6-12 dagen na ovulatie; bij geen van deze dieren was het vagina-epitheel 72 uur na de eerste injectie verhoornd; bij microscopisch onderzoek toonde het uitgebreide mucificatie (fig.8). Soortgelijke injecties werden aan 4 andere dieren gegeven vanaf 15-19 dagen na ovulatie. Bij alle 4 dieren was het vagina-epitheel 72 uur na de eerste injectie verhoornd (fig.8). Het lijkt aannemelijk, dat vaginale mucificatie van (R)NC- $\delta\delta$  tenminste in de eerste fase samenhangt met productie van progesteron.

De gemiddelde duur van de intervallen tussen opvolgende ovulaties werd bij 15 dieren bepaald aan de hand van dagelijkse vagina-uitstrijken. Deze gemiddelde duur was 26.0 dagen (tabel 10); de spreiding in de duur was 10 %.

Geconcludeerd wordt, dat (R)NC- $\delta\delta$  naast 5-daagse cyclische ovariumactiviteit ook perioden van constante duur met luteale activiteit vertonen; aldus vertonen (R)NC- $\delta\delta$  met ovariumtransplantaten een verschijnsel, dat doet denken aan spontane pseudozwangerschap van vrouwelijke ratten; de gemiddelde duur van deze 'pseudozwangerschap' bij NC- $\delta\delta$  is echter dubbel zo lang als die van normale vrouwelijke ratten.

*exp.2 Luteale activiteit in NC- $\delta\delta$  na ectopische implantatie van hypofyseweefsel*

Allereerst werd ovariumactiviteit bestudeerd na ectopische implantatie van hypofyseweefsel bij 8 cyclische (RU)NC- $\delta\delta$  en 5 (R)NC- $\delta\delta$ ; deze laatste dieren hadden in de periode, voorafgaand aan hypofyse-implantatie, reeds spontane luteale activiteit vertoond, als beschreven in exp. 1.

Tabel 10 : De duur van luteale fasen \* in NC-♂♂ onder diverse experimentele omstandigheden.

---

	aantal dieren	duur in dagen
(R)NC-♂♂ met spontane luteale activiteit	15 **	26.0 (2.5) ***
(R)NC-♂♂ met ectopische hypofyse	5 **	28.8 (8.0)
(RU)NC-♂♂ met ectopische hypofyse	8 **	20.1 (6.7)
(RU)NC-♂♂ , waarvan de ectopische hypofyse 6-10 dagen na ovulatie werd verwijderd	5	29.6 (0.4)
(R)NC-♂♂ na ES-VMN	6	25.5 (3.0)
anovulatoir geworden (RU)NC-♂♂ na inductie van ovulatie en CL-vorming met progesteron	8	25.2 (2.3)

---

\* duur van luteale fase = periode tussen opvolgende ovulaties

\*\* er werden per dier meerdere luteale fasen gemeten (3-8 per dier)

\*\*\* standaardafwijking van de duur in dagen

Bij geen van deze dieren trad na implantatie van de hypofyse nog 5-daags cyclische ovariumactiviteit op. Ovarium- en vaginamorfologie van 6 dieren tijdens perioden met mucificatie van dagelijkse vagina-uitstrijken, duidde op aanwezigheid van luteale activiteit.

Langdurige perioden met vaginale mucificatie werden onderbroken door korte fasen met leukocytenvrije uitstrijken, zoals op pro-oestrus en oestrus, gevolgd door leukocytenrijke uitstrijken, zoals gedurende de dioestrusdagen van de 5-daagse cyclus (tabel 2). Aan de hand van ovariummorfologische gegevens van 4 dieren werd vastgesteld, dat dergelijke uitstrijken duiden op de vorming van een nieuwe generatie CL en regressie van de voorafgaande generatie. De gemiddelde duur van de perioden tussen opeenvolgende ovulaties bedroeg bij de (RU)NC-♂♂ 20.1 dg, bij de (R)NC-♂♂ 28.8 dg (tabel 10). De spreiding in de duur was voor beide groepen relatief groot, nl. 30 %.

Vervolgens werd bij 7 andere (RU)NC-♂♂ het effect bestudeerd van verwijdering van de ectopische hypofyse kort na ovulatie. De hypofyse werd 6-10 dagen na ovulatie verwijderd. Ovulatie werd aan de hand van dagelijkse uitstrijken volgens bovengenoemde criteria vastgesteld. Bij twee van deze dieren (waarbij de hypofyse 6 en 9 dg na ovulatie werd verwijderd) had het verwijderen van de ectopische hypofyse onmiddellijk ophouden van luteale activiteit tot gevolg. De vagina-uitstrijken van deze dieren toonden op de derde dag na de ingreep een 'pro-oestrus'-beeld, op de vierde een 'oestrus'-beeld en daarna 5-daagse cyclische veranderingen. Bij de vijf andere dieren hield de mucificatie van het vagina-epitheel aan tot 27-31 dg na de vorige ovulatie; daarna volgden eveneens 5-daagse cyclische veranderingen (tabel 10).

Geconcludeerd wordt, dat cyclische NC-♂♂ opeenvolgende fasen met luteale activiteit kunnen vertonen bij aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel. De spreiding in de duur van dergelijke luteale fasen is echter relatief groot.

De aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel gedurende de eerste dagen na ovulatie in cyclische (RU)NC-♂♂ kan voldoende zijn om een langdurige luteale fase te 'triggeren', welke na extirpatie van de ectopische hypofyse onderhouden wordt door prolactine-secretie van de *in situ* hypofyse.

*exp.3 'Copulatiestimulus' en luteale activiteit in NC-♂♂*

Zoals reeds eerder beschreven (hoofdstuk 4; exp. 6.3) werd bronstgedrag van cyclische (RU)NC-♂♂ nooit gevolgd door onderbreking van de 5-daags cyclische ovariumactiviteit: bronstgedrag leidde niet tot luteale activiteit bij deze dieren.

Bij (R)NC-♂♂, die spontaan luteale activiteit vertoonden, leidde bronstgedrag tot het uitblijven van deze luteale activiteit (tabel 8).

Bij anovulatoir geworden NC-♂♂ van beide groepen kon bronstgedrag leiden tot hernieuwde CL-vorming in de anovulatoire ovaria; luteale activatie trad onder deze omstandigheden niet op (hoofdstuk 4; exp.9).

Geconcludeerd wordt, dat bronstgedrag van cyclische NC-♂♂ niet leidt tot luteale activering. De resultaten met (R)NC-♂♂ tonen aan, dat bronstgedrag eerder het optreden van luteale activiteit verhindert.

*exp.4 Effect van ES-VMN op de oestrus-dag op ovariumactiviteit in NC-♂♂*

Om te onderzoeken, of luteale activiteit kon worden geïnduceerd door ES-VMN van cyclische NC-♂♂, werd deze stimulus gegeven aan (R)NC-♂♂ op de oestrus-dag. Voor deze proef werden slechts dieren gebruikt, die in de periode onmiddellijk voorafgaand aan het experiment, minstens twee 5-daagse cycli achter elkaar hadden vertoond. De oestrus-dag werd gekozen, omdat vrouwelijke dieren op deze dag het meest gevoelig zijn voor allerlei stimuli, die luteale activiteit te weeg kunnen brengen (Everett, 1964). ES-VMN werd door luteale activiteit gevolgd bij 6/8 dieren; schijnstimulatie werd gevolgd door luteale activiteit bij 1/6 dieren. De aldus geïnduceerde luteale fase hield gedurende gemiddeld 25.5 dg aan (tabel 10).

Geconcludeerd wordt, dat ES-VMN bij NC-♂♂ luteale activiteit kan induceren; deze luteale activiteit houdt aan gedurende eenzelfde periode, als waargenomen in voorafgaande experimenten.

*exp. 5 Luteale activiteit in anovulatoir geworden (RU)NC-♂♂*

Zoals beschreven in hoofdstuk 4 (exp. 1-3) treden enige tijd na ovariumimplantatie in NC-♂♂ veranderingen op in de regulatie van ovariumactiviteit: cyclische ovariumactiviteit houdt op en een toestand ontstaat, die gekenmerkt wordt door permanente cornificatie van het vagina-epitheel en optreden van slechts follikelrijping en -atresie in het ovariumweefsel.

Onderzocht werd, in hoeverre deze klaarblijkelijke verandering in regulatie van ovulatie gepaard ging met veranderingen in regulatie van luteale activiteit.

Daartoe werd de duur van de periode met luteale activiteit bepaald, welke kon worden verkregen door éénmalige injectie van 2.5 mg progesteron in anovulatoire (RU)NC-♂♂ (hoofdstuk 4; exp. 8). De gemiddelde duur van deze fase bedroeg bij 8 dieren 25.2 dagen (tabel 10).

Geconcludeerd wordt, dat het ophouden van cyclische ovulatie in ovariumtransplantaten in (RU)NC-♂♂ niet gepaard gaat met ingrijpende veranderingen in het mechanisme, dat de duur van luteale fasen in NC-♂♂ bepaalt.

## DISCUSSIE

### § 1 Een 'vrouwelijk type' regulatie van luteale activiteit in NC-♂♂ ?

Bovengehoemde experimenten tonen aan, dat regulatie van luteale activiteit in NC-♂♂ met ovariumtransplantaten vrouwelijke kenmerken vertoont met betrekking tot de volgende aspecten:

- a. Constante duur van luteale fasen onder verschillende experimentele omstandigheden.

De gemeten variatiecoëfficiënten in 4 van de 6 in tabel 10 weergegeven proefgroepen bedroeg minder dan 12 %. Slechts bij voortdurende aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel was het resultaat verschillend en werd de variatiecoëfficiënt meer dan 30 %. Dit laatste resultaat is verschillend van dat, verkregen onder soortgelijke experimentele omstandigheden in vrouwelijke ratten (Alloiteau, 1958; Quilligan

& Rothchild, 1960).

- b. Inductie van een fase met luteale activiteit van gedefinieerde duur onder invloed van de aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel gedurende de eerste tijd na ovulatie.

Aangezien luteale activiteit in ratten afhankelijk is van voortdurende stimulatie van CL door prolactine (Everett, 1956; Zeilmaker & Carlsen, 1962), moet het onderhouden van luteale activiteit na extirpatie van de ectopische hypofyse veroorzaakt worden door prolactine-secretie door de *in situ* hypofyse. Deze kan blijkbaar onder invloed van de werkzaamheid van de ectopische hypofyse gedurende de eerste dagen na ovulatie een afgiftepatroon van gonadotropine gaan vertonen, zoals normaal bij luteale activiteit optreedt. Hetzelfde verschijnsel werd waargenomen bij vrouwelijke ratten (Alloiteau, 1958); na extirpatie van ectopisch hypofyseweefsel in AC-♂♂ houdt luteale activiteit onmiddellijk op (Zeilmaker, 1963).

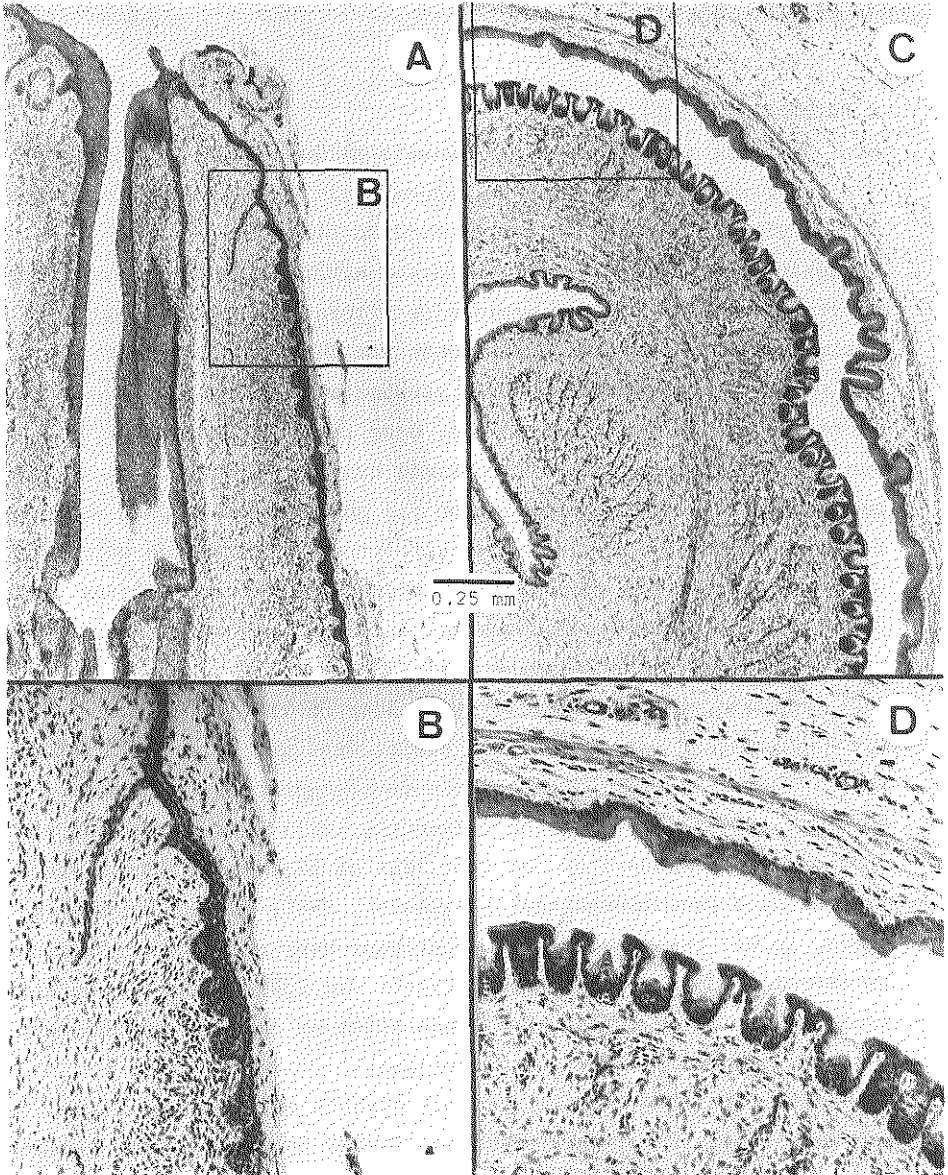
- c. Inductie van luteale activiteit door ES-VMN.

Uit experimenten met vrouwelijke ratten werd geconcludeerd, dat ES-VMN bij uitstek geschikt was om pseudo-zwangerschap te initiëren (Everett & Quinn, 1966; Quinn & Everett, 1967). Deze conclusie was onder andere gebaseerd op het feit, dat na ES-VMN het verschijnsel van 'delayed pseudopregnancy' (Zeilmaker, 1965) kon worden waargenomen. In het boven beschreven experiment werd geen poging ondernomen om enerzijds de mogelijke specificiteit van lokalisatie van de elektrode in de VMN te onderzoeken, anderzijds om ook het verschijnsel 'delayed pseudopregnancy' te verkrijgen.

Als zodanig is dit resultaat dan ook slechts een summiere aanduiding van een 'vrouwelijk type' effect van ES-VMN in NC-♂♂. Het resultaat staat echter in duidelijk contrast met resultaten van soortgelijke experimenten in TP-♀♀ (Zeilmaker et al., 1967) en AC-♂♂ (hoofdstuk 6).

- d. Afwezigheid van inductie van luteale activiteit door bronstgedrag, als dit gedrag niet tevens leidt tot stimulatie van afferente banen in de *nervus pelvicus*.

Bij mannelijke dieren zijn geen uitwendig bereikbare delen van het genitaal-apparaat, welke door de *nervus pelvicus* worden geïnnerveerd. Afferente prikkels uit de *glans penis* spelen een belangrijke rol bij



Figuur 9 : Doorsneden door de glans penis en het preputium van een normale (c en d: transversale doorsnede) en een neonataal gecastreerde (a en b: longitudinale doorsnede) mannelijke rat.

Bij de normale rat is het preputium gescheiden van de glans penis; deze laatste is bezet met talrijke hoornpapillen, die een belangrijke rol spelen bij het tot stand komen van de ejaculatie-reflex; bij de neonataal gecastreerde rat is de scheiding tussen het preputium en de glans penis niet tot stand gekomen; op de glans is de eerste aanleg zichtbaar van een gering aantal papillae. (De leeftijd van beide dieren ongeveer 6 mnd.).



het tot stand komen van de ejaculatie-reflex (Aronson & Cooper, 1968); deze afferente prikkels worden naar het CZS geleid via de *nervus dorsalis penis*, welke via de *nervus pudendus* naar het ruggemerg loopt. Aangezien bij NC-♂♂ de *glans penis* geheel omsloten blijft door het *preputium*, en op de glans penis geen *papillae* aanwezig zijn (fig. 9), is het onwaarschijnlijk, dat stimuli van de *glans* het CZS bereiken.

Aldus is het niet aannemelijk, dat 'copulatie' van NC-♂♂ tot specifieke stimulatie leidt van zenuwen die ofwel bij vrouwelijke (*nervus pelvicus*) ofwel bij mannelijke (*nervus dorsalis penis*) dieren een belangrijke rol spelen bij inductie van pseudozwangerschap (Kollar, 1953) resp. ejaculatie (Aronson & Cooper, 1968).

e. De duur van luteale fasen leek echter een aan NC-♂♂ eigen kenmerk te zijn.

Deze duur bleek gemiddeld ongeveer tweemaal zo lang als de duur van pseudozwangerschap in normale vrouwelijke ratten. Perioden met luteale activiteit van 27-31 dg, als beschreven in exp. 2, komen bij vrouwelijke ratten nauwelijks voor (Bruce, 1958; Rothchild, 1960; Takahashi & Suzuki, 1971). In een studie, waarin ononderbroken luteale activiteit gedurende 34 dagen werd beschreven, verkregen door verlengde lactatie (Canivenc & Mayer, 1953), werd waarschijnlijk onvolgende rekening gehouden met gedurende dergelijke perioden optredende nieuwe ovulaties (Bruce, 1958).

Er zijn een drietal factoren, die voor de relatief lange duur van luteale activiteit in NC-♂♂ verantwoordelijk kunnen zijn:

1. de afwezigheid van uterusweefsel; de duur van pseudozwangerschap in gehysterectomeerde vrouwelijke ratten bedraagt 18-25 dg (Anderson et al., 1967);
  2. de transplantaatconditie van het ovarium; het is beschreven, dat de duur van pseudozwangerschap in vrouwelijke ratten met slechts getransplanteerd ovariumweefsel over het algemeen langer is dan die van normale ratten (Anderson et al., 1967);
  3. het groter aantal CL, dat per cyclus in NC-♂♂ wordt gevormd.
- Voor deze laatste aanname zijn echter geen experimenteel getoetste argumenten aan te voeren. De duur van pseudozwangerschap in normale vrouwelijke ratten lijkt onafhankelijk van - toevallige - variaties in de aantallen CL; unilaterale ovariectomie in het begin van pseudozwangerschap heeft geen effect op de duur van de pseudozwangerschap (De Greef, in voorber.).

Op grond van bovenstaande gegevens lijkt het mogelijk om het verschil in de duur van luteale activiteit bij NC-♂♂ en bij normale vrouwelijke ratten terug te brengen tot bovengenoemde factoren; geen van deze factoren lijkt primair te maken te hebben met condities van regulatiemechanismen binnen het CZS.

Het lijkt verantwoord om te concluderen, dat NC-♂♂ een 'vrouwelijk' type regulatiemechanisme hebben van de duur van luteale activiteit.

## § 2 *Initiatie en onderhoud van luteale activiteit*

Luteale activiteit, aangezet door de aanwezigheid van een ectopische hypofyse gedurende de eerste dagen na ovulatie (exp.2) of door ES-VMN, hield gedurende de aan NC-♂♂ eigen periode van 20 - 30 dagen aan. Deze experimenten tonen aan, dat, als initiatie van luteale activiteit door een exogene stimulus eenmaal heeft plaatsgevonden het verschijnsel door endogene interactie van CZS, hypofyse en ovarium in stand gehouden kan worden. De exogene, initiërende stimulus is slechts gedurende een beperkte periode vereist.

Soortgelijke resultaten werden verkregen met dergelijke experimenten in vrouwelijke ratten (Alloiteau, 1958; Everett & Quinn, 1966). Daarentegen bleek bij experimenten met AC-♂♂ (Zeilmaker, 1963), dat de exogene stimulus van luteale activiteit voortdurend aanwezig moest zijn om luteale activiteit in stand te houden; een endogeen mechanisme om luteale activiteit te onderhouden kon niet worden aangetoond.

Resultaten met vrouwelijke ratten wezen uit, dat de initiërende stimulus van luteale activiteit wellicht niet altijd via hetzelfde mechanisme luteale activiteit induceerde. Terwijl bijv. injectie van progesteron (Rothchild & Schubert, 1963) of reserpine (Barraclough & Sawyer, 1959) slechts op bepaalde dagen van de cyclus tot luteale activiteit leidde, bleek ES-VMN gedurende de gehele cyclus effectief (Everett & Quinn, 1959) evenals cervix-stimulatie (Greep & Hisaw, 1965); de copulatiestimulus kon zelfs nog zeer lange tijd na de eigenlijke stimulus tot luteale activiteit aanleiding geven (Zeilmaker, 1965). In al deze gevallen blijft pseudozwangerschap gedurende 13-15 dagen onderhouden.

Het is dus mogelijk, dat er voor initiatie en onderhoud van luteale activiteit verschillende mechanismen zijn en dat een uniform 'onderhoudsmechanisme' door een van de 'initiatiemechanismen' op gang kan worden gebracht.

In verband met bovengenoemde inductie van luteale activiteit bij NC-♂♂ door ES-VMN is het wellicht van belang op te merken, dat in de gekozen proefopzet de werking van ES-VMN als mogelijke specifieke initiator van luteale activiteit moeilijk aan te duiden is; eventuele niet-specifieke factoren die ES-VMN begeleiden, zouden het onderhoudsmechanisme eveneens kunnen activeren, waardoor een ongeveer 26 dagen durende luteale fase verschijnt. Het lijkt wenselijk het probleem nader te onderzoeken aan de hand van het model van de 'delayed pseudo-pregnancy' (Zeilmaker, 1965), waarmee het beter mogelijk lijkt het mechanisme van initiatie en onderhoud van luteale activiteit te scheiden (Quinn & Everett, 1967; Everett, 1968).

### § 3 *Spontane luteale activiteit in (R)NC-♂♂*

In de discussie van hoofdstuk 4 werd gesuggereerd, dat spontane luteale activiteit bij (R)NC-♂♂ samenhangt met de werking van perinatale testishormonen in deze dieren. Deze veronderstelling zal hier nader worden toegelicht.

Het verschijnsel van opeenvolgende pseudozwangerschappen in plaats van 5-daagse cyclische ovariumactiviteit is bij vrouwelijke ratten beschreven na ectopische implantatie van hypofyseweefsel (Alloiteau, 1958) en in gevallen van hypothalamus- of hypofyse-dysfunctie (laesies resp. tumoren - Richter, 1957). In beide gevallen lijkt verhoging van de bloedspiegel van prolactine tengevolge van gehele resp. gedeeltelijke hypothalamus-hypofyse ontkoppeling de directe aanleiding voor de voortdurende luteale activering.

Spontane pseudozwangerschappen zijn eveneens beschreven bij seniele vrouwelijke ratten (Mandl, 1961; Aschheim, 1964/65). Een fase met spontane pseudozwangerschappen bleek bij sommige stammen van ratten op te treden tussen een periode met normale cyclische ovariumactiviteit en polyfolliculaire anovulatie. Anders dan de in bovenstaande alinea genoemde dieren vertonen seniele ♀♀ naast pseudozwangerschappen ook 5-daagse cycli (pers.waarn.); bovendien kan een kortdurende ingreep

- eenmalige injectie met ergocornine - het verschijnsel van spontane pseudozwangerschappen voor lange tijd doen verdwijnen (Aschheim, 1966). Het lijkt dan ook niet waarschijnlijk, dat aan spontane pseudozwangerschappen van seniele vrouwelijke ratten een permanent verhoogde secretie van prolactine ten grondslag ligt. Het mechanisme kan zeer verschillend zijn van dat, waardoor spontane pseudozwangerschappen in dieren met hypothalamuslaesies of hypofysetumoren veroorzaakt worden (zie ook par. 2, hieraan voorafgaand).

Aangezien seniele vrouwelijke ratten naast pseudozwangerschappen ook 5-daagse cycli kunnen vertonen, kan verondersteld worden, dat het al dan niet optreden van luteale activiteit afhankelijk is van een samenspel van factoren, dat van cyclus tot cyclus anders kan verlopen en dat resulteert in het ontstaan van ófwel niet-functionele ófwel functionele CL.

Een concreet voorbeeld van een dergelijke factor zou kunnen zijn, dat variatie in de voor ovulatie afgegeven hoeveelheid gonadotropine gevolgen kan hebben op de beschikbaarheid van voor ovulatie geschikte follikels, 5 dagen later; het is aangetoond, dat de ovulatie-inducerende gonadotropinen een belangrijke rol vervullen in de rijping van follikels voor de eerstvolgende ovulatie (Welschen, 1972). Het lijkt waarschijnlijk, dat de hoeveelheid gonadotropine, welke in jongvolwassen op op de namiddag van pro-oestrus voor ovulatie wordt afgescheiden, groter is dan de minimaal noodzakelijke (Labhsetwar, 1970). Het is mogelijk, dat de aldus gecreëerde 'veiligheidsmarge' kleiner wordt bij ouderdom, bijv. ten gevolge van verminderde reactiviteit van het CZS-hypofyse-systeem (Labhsetwar, 1967). Bij een kleinere 'veiligheidsmarge' zouden relatief kleine variaties in de hoeveelheid gonadotropine relatief grote veranderingen in effect op het ovarium tot gevolg kunnen hebben.

In hoofdstuk 4 werd beargumenteerd, dat het ovulatiemechanisme van NC-♂♂ reeds partiëel vermannelijkt is onder invloed van perinatale testishormonen. Deze partiële vermannelijking manifesteerde zich op het niveau van het ovariumtransplantaat in vroeg ophouden van cyclische ovariumactiviteit. Het zou kunnen zijn, dat deze partiële vermannelijking zich op het niveau van de afgifte van gonadotropine manifesteerde in verlaging van de voor ovulatie afgegeven hoeveelheid gonadotropine. Op deze wijze zouden NC-♂♂ dan ook een intermediaire positie innemen tussen normale vrouwelijke ratten (grote hoeveelheid

voor ovulatie afgegeven gonadotropine ) en AC-♂♂ met een ovariumtransplantaat (geen voor ovulatie afgegeven gonadotropine ). In experimenten met vrouwelijke ratten in constante belichting, waarbij cyclische ovariumactiviteit eveneens na korte tijd ophoudt, werd een verlaging van de hoeveelheid voor ovulatie afgescheiden gonadotropine inderdaad waargenomen (Lawton & Schwartz, 1967; Daane & Parlow, 1971).

Een dergelijke verlaging van de voor ovulatie afgegeven hoeveelheid gonadotropine zou zich overigens stamafhankelijk kunnen manifesteren in een korte periode met 5-daagse cyclische ovariumactiviteit, (RU)NC-♂♂ , of in het optreden van luteale activiteit naast 5-daagse cycliciteit, (R)NC-♂♂ . Opvallend is, dat (RU)-♀♀ en (R)-♀♀ in de seniele levensfase een overeenkomstig verschil in ovariumactiviteit vertonen (zie Materiaal en Methoden bij hoofdstuk 4).

Het is wellicht interessant te vermelden, dat Pfeiffer (1936) pseudozwangerschapachtige verschijnselen waarnam bij een aantal vrouwelijke ratten, die ondanks neonatale testisimplantatie toch nog cyclische ovariumactiviteit op volwassen leeftijd vertoonden.

#### § 4 *Luteale activiteit in anovulatoir geworden NC-♂♂*

Exp. 5 wees uit, dat anovulatoir geworden NC-♂♂ nog luteale fasen van voor NC-♂♂ kenmerkende duur konden onderhouden. Klaarblijkelijk had het mechanisme, verantwoordelijk voor het onderhoud van luteale activiteit gedurende deze gedefiniëerde periode, geen veranderingen ondergaan, parallel aan de veranderingen in het ovulatiemechanisme.

Aangezien echter, zoals werd beschreven in hoofdstuk 4 (exp. 8 en 9), anovulatoire NC-♂♂ hernieuwde cyclische ovariumactiviteit kunnen vertonen, lijken ingrijpende veranderingen in het ovulatiemechanisme als oorzaak van anovulatie niet waarschijnlijk.

Duidelijk is dan ook, dat de toestand van anovulatie in bovengenoemde NC-♂♂ verschillend is van die van AC-♂♂ : in deze dieren is het niet mogelijk cyclische ovariumactiviteit te verkrijgen (Goodman, 1934; Quinn, 1966), noch onderhoud van luteale activiteit gedurende een gedefiniëerde periode (Zeilmaker, 1963).

## SAMENVATTING

1. NC-♂♂ kunnen onder verschillende experimentele omstandigheden fasen met luteale activiteit vertonen; de duur van dergelijke luteale fasen is constant en ongeveer tweemaal die van pseudozwangerschap bij normale vrouwelijke ratten. Het verschil wordt wellicht veroorzaakt door (1) de afwezigheid van uterusweefsel in NC-♂♂ ; (2) de transplantaatconditie van het ovarium; (3) het groter aantal per cyclus gevormde CL.
2. Een stimulus van korte duur, zoals ES-VMN of de aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel gedurende de eerste dagen na ovulatie en CL-vorming, kan een luteale fase initiëren, die na weghalen van de stimulus door het *in situ* CZS-hypofyse-systeem wordt onderhouden.
3. In de twee bovengenoemde opzichten vertoont luteale activiteit in NC-♂♂ nauwe gelijkenis met die in normale vrouwelijke ratten en verschillen met die in AC-♂♂ .
4. (R)NC-♂♂ vertonen naast 5-daagse cycliciteit ook perioden met spontane luteale activiteit na ovariumimplantatie. De spontane luteale activiteit houdt wellicht verband met gedeeltelijke 'vermannelijking' van de aanleg van het ovulatiemechanisme in de perinatale levensfase.
5. Anovulatoir geworden NC-♂♂ kunnen luteale fasen van voor NC-♂♂ karakteristieke duur vertonen. Anovulatie van NC-♂♂ verschilt in dit opzicht van anovulatie in AC-♂♂ .

## HOOFDSTUK 6 : REGULATIE VAN LUTEALE ACTIVITEIT IN AC-♂♂ EN TP-♀♀

## INLEIDING

Regulatie van luteale activiteit in NC-♂♂ (vorige hoofdstuk) verschilde in een aantal opzichten van luteale activiteit in AC-♂♂ (Zeilmaker, 1963). Verondersteld zou kunnen worden, dat deze verschillen op vergelijkbare wijze tot stand komen als die ten aanzien van optreden van ovulatie. Dit zou betekenen, dat met betrekking tot mechanismen van regulatie van luteale activiteit eveneens sprake zou zijn van: (1) een ongedifferentiëerde aanleg in de prenatale fase, die zich (2) onder invloed van testishormonen of substitutie daarvan in de neonatale fase tot een (3) eindfase, welke van die in normale vrouwelijke dieren verschilt (vergelijk fig. 1), ontwikkelde.

Een onmiddellijke gevolgtrekking uit deze veronderstelling is, dat TP-♀♀, analoog aan de situatie van het ovulatiemechanisme (Bradbury, 1941), een 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit moeten vertonen.

Er doet zich een aantal problemen voor, waardoor het moeilijk is om deze gevolgtrekking experimenteel te verifiëren. Zo heeft afwezigheid van luteale activatie na cervicale stimulatie van TP-♀♀ (Zeilmaker, 1964) uiteraard geen equivalent in AC-♂♂.

Zeilmaker (1964) beschreef verder, dat verwijderen van ectopisch hypofyseweefsel bij TP-♀♀ gedurende perioden met luteale activiteit niet onmiddellijk gevolgd werd door hernieuwde vaginale cornificatie. In eerdere experimenten met AC-♂♂ (Zeilmaker, 1963) was dit verschijnsel wél opgetreden. Het verschil tussen TP-♀♀ en AC-♂♂ werd geïnterpreteerd als een verschil in gonadotrope potentie van de hypofyse.

Zeilmaker et al. (1967) beschreven, dat ES-VMN niet tot luteale activatie leidde bij TP-♀♀; de experimenten werden niet gedaan met AC-♂♂. ES-VMN is bij normale vrouwelijke ratten wellicht een specifieke manier om luteale activiteit te induceren (Quinn & Everett, 1967).

Everett et al. (1970) beschreven stamverschillende bloedspiegels van prolactine in TP-♀♀. Prolactinesecretie komt in TP-♀♀ waarschijnlijk tot stand onder invloed van de blootstelling van de hypofyse aan oestrogene ovariumhormonen (Chen & Meites, 1970).

Behalve stam-specifiek is het optreden van prolactinesecretie in TP-♀♀ wellicht ook afhankelijk van de duur van blootstelling aan oestrogene ovariumhormonen (Aschheim, 1962) en daardoor van de leeftijd. Aangezien AC-♂♂ over het algemeen binnen 4 weken na ovariumimplantatie voor de experimenten werden gebruikt is het niet aannemelijk, dat de duur van blootstelling van de dieren aan oestrogene ovariumhormonen voldoende geweest zou kunnen zijn om eveneens tot prolactinesecretie aanleiding te geven.

In hoofdstuk 4 werd beschreven, dat het aantal CL per 'generatie' in TP-♀♀ kleiner is dan dat van AC-♂♂ . Er zijn aanwijzingen, dat de bloedspiegel van progesteron tijdens pseudozwangerschap in vrouwelijke dieren afhankelijk is van het aantal CL (Chatterjee & Harper, 1970; de Greef, in voorber.). Het lijkt niet uitgesloten, dat verschillen in bloedspiegels van progesteron tussen TP-♀♀ en AC-♂♂ een weerslag hebben op luteale activiteit in deze dieren.

Om te onderzoeken, of TP-♀♀ een 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit vertonen, zal in eerste instantie worden getracht dit 'mannelijk type' nader te definiëren. Vervolgens zal luteale activiteit in AC-♂♂ en TP-♀♀ in een aantal experimentele omstandigheden worden vergeleken. Onderzocht zal worden, in hoeverre de bovengenoemde verschillen tussen TP-♀♀ en AC-♂♂ in regulatie van luteale activiteit tot uiting komen.

MATERIAAL EN METHODEN (zie hoofdstuk 2 t/m 5).

## RESULTATEN

### *Exp. 1 Activiteit van door ECS-POA geïnduceerde CL in (RU)AC-♂♂*

De activiteit van CL, welke onder invloed van ECS-POA in ovarium-transplantaten in AC-♂♂ werden gevormd, werd onderzocht aan de hand van de morfologie van deze CL en van eveneens getransplanteerd vagina-weefsel op verschillende tijdstippen na ECS-POA. Het onderzoek werd gedaan met 38 AC-♂♂ ; ECS-POA werd bij ieder van de dieren gevolgd door de vorming van tenminste 12 CL (cf. tabel 3).



Dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten wezen uit, dat de permanente cornificatie van het vagina-epitheel vanaf de tweede dag na ECS-POA onderbroken werd voor de duur van 2 tot 5 dagen. De vagina-uitstrijken vertoonden gedurende die dagen een beeld als bij vrouwelijke ratten gedurende de dioestrus-fase (tabel 2). Na deze onderbreking trad opnieuw ononderbroken cornificatie op.

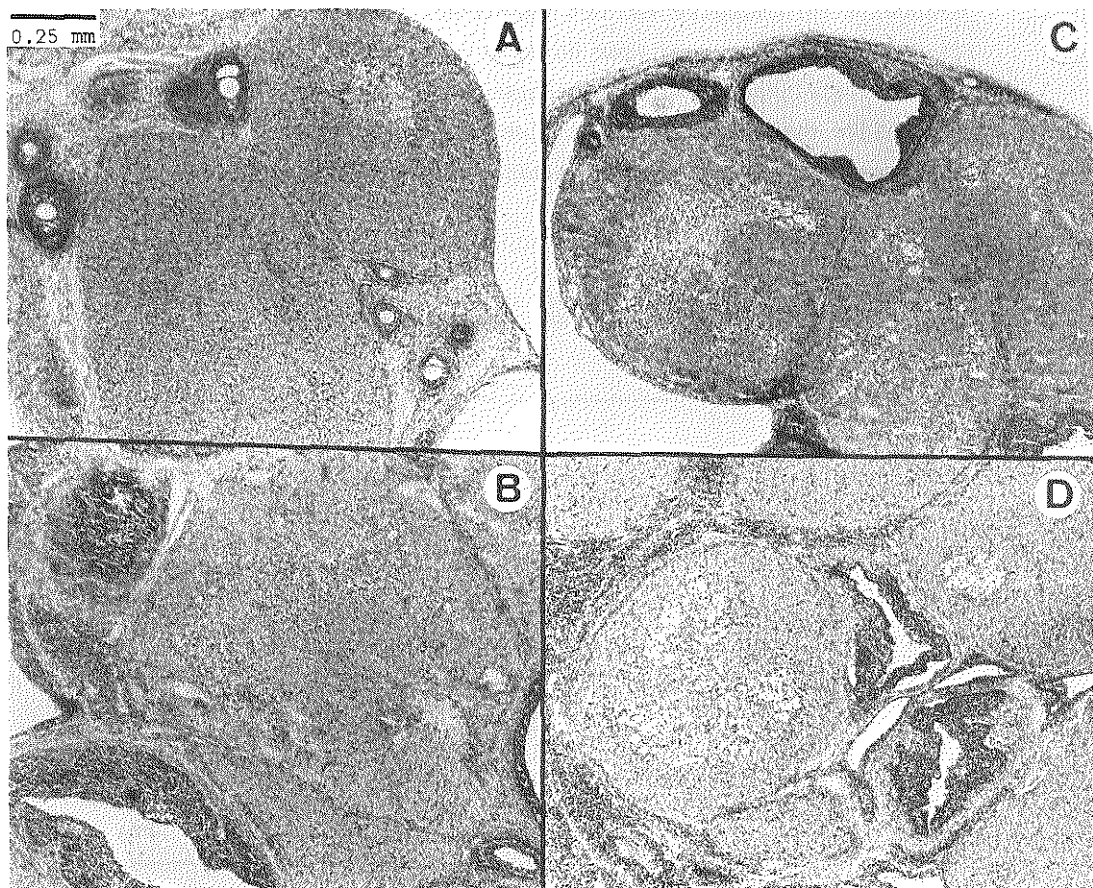
Tabel 11 : Structurele luteolyse van CL, die door ECS-POA in ovariumtransplantaten in AC-33 zijn geïnduceerd.

tijd sinds ECS-POA in dagen	aantal dieren	luteolyse-stadia			
		0*	1	2	3
2	10	10			
3	8	8			
4	6	1	3	2	
5	9		4	5	
7 )	5				
8 )				2	3
9 )					

\* de luteolyse-stadia werden aan de hand van microscopisch onderzoek als volgt gedefiniëerd

- stadium 0 : geen tekenen van structurele luteolyse aanwezig.  
 1 : kleine haarden aanwezig van luteinecellen met pyknotische kernen.  
 2 : naast haarden van cellen met pyknotische kernen ook haarden met vettige necrose.  
 3 : de CL sterk verkleind; naast geringe hoeveelheid luteinecellen veel bindweefselcellen.

Microscopisch onderzoek van onder het nierkapsel getransplanteerd vaginaweeftsel, dat 5 of meer dagen na ECS-POA werd verwijderd, wees uit,



*Figuur 10 a-d : Structurele luteolyse van CL, welke onder invloed van ECS-POA in ovariumtransplantaten in AC-♂♂ werden gevormd.*

De ovariumtransplantaten werden 3 (8,a), 4 (8,b), 5 (8,c) en 6 (8,d) dagen na ECS-POA uit de AC-♂♂ verwijderd. Na 3 dagen zijn geheel opgevulde, basofiele tot eosinofiele CL aanwezig; in latere dagen verschijnen steeds grotere luteolysehaarden in het corpus luteum-weefsel. Het patroon van verschijnen van deze luteolyse is ten opzichte van het moment van inductie van ovulatie in opvallende mate vergelijkbaar met dat van luteolyse van niet-functionele CL in ♀♀ of NC-♂♂ (fig. 5).

dat de continue afgifte van slechts verhoornde cellen aan het oppervlak van het vaginale epitheel onderbroken was door 2-5 lagen met kernhoudende cellen.

De morfologie van CL op verschillende tijdstippen na ECS-POA vertoonde veranderingen, die vergelijkbaar waren met die van niet-functionele CL in de ovaria van 5-daags cyclische vrouwelijke ratten. Zoals weergegeven in tabel 11 en fig. 10 trad structurele luteolyse van het CL-weefsel vanaf de vierde dag na ECS-POA bij alle onderzochte dieren op.

Geconcludeerd wordt, dat CL, die na ECS-POA in ovariumtransplantaten in AC-♂♂ worden gevormd, geen functionele activiteit vertonen. De CL lijken structurele luteolyse te ondergaan volgens een definiëerbaar patroon, dat nauwe overeenkomst met dat van niet-functionele CL in 5-daags cyclische vrouwelijke ratten vertoont. De waarnemingen doen vermoeden, dat het karakteristieke luteolyse-patroon van niet-functionele CL in grote trekken onafhankelijk is van de mogelijkheid tot spontane afgifte van ovulatoire hormonen.

Soortgelijke waarnemingen werden verricht bij TP-♀♀ ; ECS-POA werd bij ieder dier door de vorming van 10 of meer CL gevolgd (cf tabel 3). De permanente vaginale cornificatie van deze dieren werd voor de duur van 6-10 dagen vanaf de tweede dag na ECS-POA onderbroken. Microscopisch onderzoek van 10 ovaria, die 4 of 5 dagen na ECS-POA werden onderzocht, wees uit dat de structurele luteolyse nog niet was begonnen (tabel 12); daarentegen werd deze wél aangetroffen in alle 3 ovaria, welke 9 dagen na ECS-POA werden onderzocht.

Geconcludeerd wordt, dat luteolyse van CL, die in TP-♀♀ gevormd worden onder invloed van ECS-POA, volgens een patroon verloopt, dat verschilt van dat van niet-functionele CL in normale vrouwelijke ratten en van door ECS-POA geïnduceerde CL in AC-♂♂ . Met name lijkt het erop, dat de luteolyse vertraagd verloopt in vergelijking met de andere gevallen. De verhoogde prolactine-productie, welke in TP-♀♀, stamafhankelijk, kan worden waargenomen (Everett et al. 1970), zou hiervoor verantwoordelijk kunnen zijn.

Tabel 12 : Structurele luteolyse in TP-♀♀ en AC-♂♂ op verschillende tijdstippen na ECS-POA.

---

tijd sinds ECS-POA in dagen	TP-♀♀	AC-♂♂
4	0 / 6*	5 / 6
5	0 / 4	9 / 9
9	3 / 3	5 / 5

---

\* aantal dieren met structurele luteolyse in de door ECS-POA geïnduceerde CL / aantal onderzochte dieren

*Exp. 2 Luteale activiteit onder invloed van ectopisch hypofyseweefsel*

Luteale activiteit bij voortdurende aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel werd bestudeerd bij 18 AC-♂♂, waarbij ECS-POA gevolgd werd door de vorming van tenminste 12 CL.

Bij alle dieren werd de permanente vaginale cornificatie vanaf de tweede dag na ECS-POA verbroken; na enkele dagen met 'dioestrus'-uitstrijken van het vaginale epitheel trad mucificatie van dergelijke uitstrijken op.

De periode met vaginale mucificatie eindigde meestal tamelijk abrupt met het verschijnen van grote hoeveelheden kernhoudende epitheelcellen gedurende 1 dag, gevolgd door permanente cornificatie. Microscopisch onderzoek van 6 ovaria gedurende de perioden met hernieuwde cornificatie wees uit, dat de CL in regressie waren en dat hernieuwde follikelontwikkeling ruimschoots aanwezig was; ECS-POA gedurende deze periode werd gevolgd door de vorming van een nieuwe generatie CL: bij 9 dieren werden gemiddeld 17.9 CL gevormd.

De duur van de luteale fasen onder deze experimentele omstandigheden werd vastgesteld door telling van het aantal dagen vanaf de dag van ECS-POA tot de eerste dag, waarop hernieuwde volledige cornificatie van de vagina-uitstrijk werd waargenomen. De aldus bepaalde duur van de luteale fasen bij bovengenoemde dieren was erg variabel en bedroeg 17 - 51 dagen; de mediane duur bedroeg 34 dagen (tabel 13).

Tabel 13 : Duur van luteale fasen\* in cyclische vrouwelijke ratten, TP-♀♀ en AC-♂♂ onder invloed van een ectopisch getransplanteerde hypofyse, afkomstig van een volwassen donor.

	aantal dieren	duur van de luteale fasen mediaan	spreiding
cyclische ♀♀	8	16	14 - 17
TP-♀♀	18	28	14 - meer dan 35
AC-♂♂	18	34	17 - 51
AC-♂♂**	6	10	8 - 12

\* Duur van luteale fasen = duur van de periode tussen opeenvolgende ovulaties in normale vrouwelijke ratten.  
= duur van de periode tussen ECS-POA en aanvang van hernieuwde permanente vaginale cornificatie.

\*\* bij deze 6 dieren was slechts de halve hypofyse van een 40 dagen oude donor onder het nierekapsel getransplanteerd.

Om te onderzoeken of de vaginale mucificatie verband hield met de produktie van grote hoeveelheden progesteron door de CL werden aan 6 dieren 3 dagelijkse injecties met 25 µg OB gegeven vanaf 7-14 dagen na ECS-POA; bij geen van deze dieren werd het vagina-epitheel ver-

hoornd; het microscopisch aspect ervan 72 uur na de eerste injectie vertoonde meerlagig, gemucificeerd epitheel als in fig.8. Werden daarentegen de injecties gegeven vanaf 34-45 dagen na ECS-POA (7 dieren), dan trad vaginale cornificatie vanaf 48 uur na de eerste injectie op. Vaginale mucificatie keerde echter bij 2 dieren enkele dagen later terug; de ovariummorfologie van 4 andere dieren wees uit, dat injectie van OB niet resulteerde in de vorming van nieuwe CL. Het lijkt derhalve aannemelijk, dat cornificatie na OB-injecties ook optreedt, indien nog geringe luteale activiteit aanwezig is.

Om te onderzoeken of de duur van de luteale fasen bij AC-♂♂ afhankelijk was van de hoeveelheid geïmplanteerd hypofyseweefsel, werd de boven verkregen duur vergeleken met die van dieren waarbij slechts een halve hypofyse onder het nierepithelium was geïmplanteerd. De duur van de luteale fase was bij alle 6 onderzochte dieren veel korter dan in de bovengenoemde groep (tabel 13).

Geconcludeerd wordt, dat ectopisch hypofyseweefsel luteale activiteit bij AC-♂♂ kan induceren en onderhouden. De duur van de periode met luteale activiteit bij aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel is erg variabel; de duur blijkt zeer afhankelijk te zijn van de hoeveelheid ectopisch geïmplanteerd hypofyseweefsel. In de eerste weken na ECS-POA wordt voldoende progesteron door de functionele CL geproduceerd om cornificatie van vagina-epitheel onder invloed van een grote hoeveelheid geïnjecteerd OB tegen te gaan.

De duur van luteale fasen, werd onder soortgelijke experimentele omstandigheden bestudeerd bij 18 TP-♀♀ ; ECS-POA had de vorming van tenminste 10 CL tot gevolg. De duur van de luteale fasen - welke aan de hand van vagina-uitstrijken op gelijke wijze kon worden vastgesteld als boven beschreven voor AC-♂♂ - bedroeg van 14 tot meer dan 35 dagen; de mediane duur bedroeg 28 dagen (tabel 13).

Geconcludeerd wordt, dat luteale activiteit onder invloed van ectopisch hypofyseweefsel in TP-♀♀ minder lang aanhoudt dan in AC-♂♂ . Wellicht houdt dit verband met het kleinere aantal CL, dat in TP-♀♀ na ECS-POA wordt gevormd (tabel 3).

*Exp. 3 Effect van het verwijderen van ectopisch hypofyseweefsel op luteale activiteit*

Om te onderzoeken, of het *in situ* CZS-hypofyse-systeem luteale activiteit, geïnduceerd door ectopisch hypofyseweefsel, kon onderhouden, werd de ectopische hypofyse op verschillende tijdstippen na ECS-POA bij 11 AC-♂♂ verwijderd (tabel 14). Aan de hand van dagelijkse vagina-uitstrijken kon worden vastgesteld, dat verwijderen van de ectopische hypofyse onmiddellijk ophouden van luteale activiteit tot gevolg had. Het uitstrijkpatroon - 'pro-oestrus' op de derde, 'oestrus' vanaf de vierde dag na de ingreep - is hetzelfde als verkregen na onderbreking van luteale activiteit in vrouwelijke ratten met ergocornine (Zeilmaker & Carlsen, 1962).

Schijnoperatie leidde niet tot ophouden van luteale activiteit bij 4 dieren.

Geconcludeerd wordt, dat het onderhoud van luteale activiteit in AC-♂♂ bij aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel geheel afhankelijk is van de werkzaamheid van de ectopische hypofyse; het *in situ*-CZS-hypofyse-systeem wordt niet onder invloed van luteale activiteit geactiveerd tot langdurige secretie van prolactine.

Extirpatie van de ectopische hypofyse bij TP-♀♀ binnen 10 dagen na ECS-POA werd niet onmiddellijk gevolgd door ophouden van luteale activiteit (tabel 14). Na extirpatie op de zesde dag na ECS-POA kon, met behulp van 3 dagelijkse injecties met 25 µg OB, de secretie van progesteron tot een week na de ingreep worden aangetoond (4 dieren).

De luteale activiteit hield evenwel onmiddellijk op, als de ectopische hypofyse 16-19 dagen na ECS-POA werd verwijderd (tabel 14). Rekening moet hierbij echter gehouden worden met het feit, dat na een periode van 16-19 dagen bij een gedeelte van de niet-geopereerde dieren de luteale activiteit reeds was opgehouden (tabel 13).

Zeilmaker (1964) beschreef eveneens uitblijven van vaginale cornificatie bij TP-♀♀ na extirpatie van de ectopische hypofyse gedurende perioden met luteale activiteit. Anders dan in bovengenoemd experiment kon hij echter geen persisterende luteale activiteit aantoo-

nen; het uitblijven van vaginale cornificatie werd volgens hem veroorzaakt door de geringe gonadotrope potentie van de hypofyse van

TP- $\frac{00}{++}$

Tabel 14 : *Effect van verwijderen van de ectopische hypofyse of injectie van ergocornine op luteale activiteit in TP- $\frac{00}{++}$  en AC- $\frac{33}{++}$ .*

---

	ingreep	effect
11 AC- $\frac{33}{++}$	verwijderen van ectopische hypofyse 6 - 19 dagen na ECS-POA	luteale activiteit stopt onmiddellijk *
4 AC- $\frac{33}{++}$	schijnoperatie 6 - 7 dagen na ECS-POA	luteale activiteit houdt aan
18 TP- $\frac{00}{++}$	verwijderen van ectopische hypofyse 6 - 10 dagen na ECS-POA	luteale activiteit houdt tot 6 - 11 dagen na de ingreep aan
4 TP- $\frac{00}{++}$	verwijderen van ectopische hypofyse 16 - 19 dagen na ECS-POA	luteale activiteit stopt onmiddellijk
5 TP- $\frac{00}{++}$	schijnoperatie 6 - 7 dagen na ECS-POA	luteale activiteit houdt aan
5 TP- $\frac{00}{++}$	1 mg ergocornine 6 - 7 dagen na ECS-POA	luteale activiteit stopt onmiddellijk

---

\* deze uitspraak werd gebaseerd op het hernieuwd optreden van permanente vaginale cornificatie vanaf de derde dag na de ingreep.

Om deze laatste veronderstelling te onderzoeken, werd luteale



activiteit bij aanwezigheid van ectopisch hypofyseweefsel in 5 TP-♀♀ afgebroken door ergocornine. Aan deze dieren werd 6-7 dagen na ECS-POA een éénmalige injectie met 1 mg ergocornine gegeven.

Bij alle 5 dieren vertoonde de vagina-uitstrijk drie dagen later een 'pro-oestrus'-beeld en cornificatie vanaf de vierde dag na injectie; derhalve werd nu hetzelfde beeld verkregen als na extirpatie van de ectopische hypofyse bij AC-♂♂ .

Geconcludeerd wordt, dat luteale activiteit in TP-♀♀, geïnduceerd door ectopisch hypofyseweefsel, onderhouden kan worden door het *in situ* CZS-hypofyse systeem, tenminste in de eerste 10 dagen na ECS-POA.

Dit zou wellicht veroorzaakt kunnen worden, doordat de *in situ* hypofyse geactiveerd wordt tot secretie van prolactine onder invloed van de luteale activering, geïnduceerd door de ectopische hypofyse. Het zou echter ook mogelijk zijn, dat het onderhouden van luteale activiteit berust op de voortdurend aanwezige secretie van prolactine bij TP-♀♀ , zoals reeds eerder bij exp. 1 genoemd.

#### *Exp. 4 Effect van ES-VMN in AC-♂♂*

Om te onderzoeken of ES-VMN in AC-♂♂ leidde tot luteale activering, werd het effect van ES-VMN onderzocht op (1) CL-morfologie op verschillende tijdstippen na ECS-POA en (2) op het onderhouden van luteale activiteit door een ectopische hypofyse, welke 48 uur na ECS-POA werd geïmplanteerd.

De morfologie van CL werd bestudeerd bij 22 AC-♂♂ , waarbij ECS-POA de vorming van tenminste 12 CL tot gevolg had. ES-VMN werd 24 uur na ECS-POA gegeven, derhalve ten opzichte van ovulatie op hetzelfde tijdstip als waarop ES-VMN in eerdere experimenten (hoofdstuk 5; exp. 4) aan NC-♂♂ werd gegeven. De CL-morfologie werd 5-8 dagen na ECS-POA bestudeerd en vergeleken met die van dieren, welke geen ES-VMN hadden gekregen (tabel 11).

Bij 6/22 dieren vertoonden de CL nog geen morfologische tekenen van luteolyse op een tijdstip, dat die van onbehandelde dieren reeds uitgebreide luteolyse vertoonden. Bij de overige 16 dieren werd geen, van onbehandelde dieren verschillend luteolysepatroon gevonden.

Geconcludeerd wordt, dat ES-VMN tot uitstel van structurele luteolyse van door ECS-POA geïnduceerde CL kan leiden. Aangezien structurele luteolyse mede onder invloed van gonadotropine tot stand komt, (Descelin, 1958) is het niet duidelijk of dit uitstel van luteolyse het gevolg is van activering van CL door prolactine of van veranderingen in secretie van gonadotropine onder invloed van ES-VMN. Getracht werd om dit in een tweede experiment nader te analyseren.

Uitgangspunt voor dit experiment was, dat CL in ratten voortdurende luteotrope stimulatie nodig hebben om actief te blijven (Everett, 1956); kortstondige onderbreking van de luteotrope stimulatie, bijv. door middel van een éénmalige injectie met ergocornine (Zeilmaker & Carlsen, 1962) doet ze geheel ten gronde gaan.

Het werd op grond van exp. 4 mogelijk geacht, dat ES-VMN bij AC-♂♂ tot kortstondige luteotrope stimulatie leidde. Dan zou ook verwacht mogen worden, dat het met ES-VMN gedurende langere tijd na ECS-POA mogelijk was om luteale activiteit door implantatie van een ectopische hypofyse te onderhouden dan zonder ES-VMN of met alleen schijnstimulatie.

Bij 22 AC-♂♂ werd ECS-POA gevolgd door de vorming van tenminste 12 CL. Vierentwintig uur na ECS-PLA werd ófwel ES-VMN gegeven (12 dieren), ófwel schijn-ES-VMN (8 dieren), ófwel geen stimulatie (2 dieren). Achtenveertig uur na ECS-POA werd bij alle dieren een hypofyse onder het nierkapsel aangebracht.

Aan de hand van dagelijkse uitstrijken na deze operatie en ovarium-morfologische gegevens bij autopsie werden drie verschillende reacties op de experimentele procedure onderscheiden (tabel 15).

Het resultaat, verkregen in de gestimuleerde groep dieren was niet verschillend van dat, verkregen in de controlegroep (tabel 15).

Geconcludeerd wordt, dat ES-VMN bij AC-♂♂, gegeven 24 uur na de inductie van CL-vorming door ECS-POA, een uitstel teweeg kan brengen in de structurele luteolyse. Het lijkt echter niet waarschijnlijk, dat deze uitgestelde regressie veroorzaakt wordt door luteotrope stimulatie als gevolg van ES-VMN.

*Tabel 15 : Activering van CL in ovariumtransplantaten in AC-♂♂ door ectopisch hypofyseweefsel, dat 48 uur na ECS-POA wordt geïmplaneerd; effect van ES-VMN, 24 uur na ECS-POA.*

---

	CL-activiteit onder invloed van *		
	+++	+	0
ES-VMN	4 / 12	5 / 12	3 / 12
schijn ES-VMN of geen operatie	2 / 10	7 / 10	1 / 10

---

\* luteale activiteit werd als volgt geklassificeerd:

- +++ : 8 of meer dagen na implantatie van de ectopische hypofyse veroorzaakten 3 dagelijkse injecties met 25 µg OB geen cornificatie van eveneens geïmplaneerd vagina-epitheel.
- + : bovengenoemde procedure veroorzaakte wel cornificatie van geïmplaneerd vagina-epitheel, maar de CL vertonen op dat moment nog geen structurele luteolyse.
- 0 : 10-14 dagen na ECS-POA zijn nog slechts atrofische CL in de ovariumtransplantaten aanwezig; vagina-uitstrijken waren vanaf 6 - 8 dagen na ECS-POA opnieuw gecornificeerd.

## DISCUSSIE

### § 1 *Nadere definiëring van het 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit*

Uit de boven beschreven experimenten kunnen de volgende kenmerken van regulatie van luteale activiteit bij AC-♂♂ worden afgeleid:

- a. CL, die na ECS-POA worden gevormd, vertonen geen luteale activiteit; de structurele luteolyse verloopt tenminste in grote trekken zoals die van niet-functionele CL in normale vrouwelijke ratten en 5-daags cyclische NC-♂♂ .

b. Luteale activiteit, geïnduceerd en onderhouden door ectopisch hypofyseweefsel, kan zeer lang aanhouden; de duur van dergelijke perioden met luteale activiteit is in sterke mate afhankelijk van de hoeveelheid ectopisch geïmplanteerd hypofyseweefsel. De periode van luteale activiteit vertoont geen kenmerkende duur.

*Daarentegen houdt luteale activiteit in normale vrouwelijke ratten onder verschillende experimentele omstandigheden gedurende een periode met kenmerkende duur aan.*

c. Onderhoud van luteale activiteit in AC- $\delta\delta$  is afhankelijk van de voortdurende werkzaamheid van de exogene, luteotrope stimulus; het blijkt niet mogelijk een endogeen mechanisme voor onderhouden van luteale activiteit te activeren.

Zelfs bij continue aanwezigheid van de luteotrope stimulus houdt de luteale activiteit niet onbeperkt aan; de CL gaan na verloop van tijd ten gronde; de dan in het ovariumweefsel aanwezige follikels kunnen onder invloed van een adekwate, exogene stimulus een nieuwe generatie CL vormen.

*Daarentegen blijft bij vrouwelijke ratten bij voortdurende aanwezigheid van een exogene, luteotrope stimulus een endogeen mechanisme werkzaam, dat met regelmatige intervallen luteolyse, ovulatie en nieuwe CL-vorming bewerkstelligt.*

d. Het is waarschijnlijk niet mogelijk om door middel van stimulatie van het CZS inductie van luteale activiteit te bewerkstelligen.

*Daarentegen kan luteale activiteit verkregen worden door elektrische stimulatie van een groot deel van de hypothalamus bij vrouwelijke ratten.*

ad a.

Dat CL, geïnduceerd in ovariumtransplantaten in AC- $\delta\delta$  geen spontane luteale activiteit vertoonden, was reeds eerder beschreven door Yazaki (1959) en Zeilmaker (1962): CL-vorming werd geïnduceerd met HCG en de waarnemingen verricht aan dagelijkse vagina-uitstrijken resp. morfologie van onder het nierepithelium getransplanteerd ovariumweefsel.

Exp. 1 in dit hoofdstuk maakte echter duidelijk, dat de CL niet alleen geen luteale activiteit vertoonden, maar ook dat ze wél een luteolysepatroon vertoonden, dat tenminste in grote trekken overeen-

kwam met dat van niet-functionele CL in normale vrouwelijke ratten.

Deze waarnemingen rechtvaardigen wellicht de uitspraak, dat de regulatie van luteolyse van niet-functionele CL primair berust bij het 'tonic system' (Barraclough, 1966) van regulatie van ovariumactiviteit, dat verondersteld wordt geen belangrijke geslachtsverschillen te vertonen. Gegevens van Everett (1945, 1947) demonstreren weliswaar verschijnselen, die aan de ovulatoire gonadotropine-afgifte gecorreleerd kunnen worden, in de luteolyse van niet-functionele CL, maar dit betreft een detail -nl. verschillen in accumulatie van lipoid materiaal in de luteïne-cellen- in de loop van de dag van pro-oestrus, dus in de loop van een proces, dat reeds lang voor pro-oestrus een aanvang neemt.

ad b. en c.

Ten aanzien van het tweede en derde kenmerk van luteale activiteit kan een duidelijk geslachtsverschil gedefiniëerd worden. In AC-♂♂ wordt luteale activiteit niet gedurende een periode met kenmerkende duur onderhouden en het is niet mogelijk een endogeen mechanisme te activeren van onderhoud van luteale activiteit. Deze beide verschillen in regulatie van luteale activiteit tussen AC-♂♂ en ♀♀ waren reeds door Zeilmaker (1962, 1963) herkend.

Bij vrouwelijke ratten werd overigens beschreven, dat luteale activiteit ten gevolge van lactatie afhankelijk is van de voortdurende aanwezigheid van de lactatiestimulus (Alloiteau, 1962; Donovan & Harris, 1966; Gala, 1970; Takahashi & Suzuki, 1971; Zarrow et al., 1973). Er zijn mogelijkwerwijs echter stamverschillen, daar Zeilmaker (1965) beschreef, dat pseudozwangerschap geïnduceerd kon worden na lactatie gedurende slechts twee dagen. Gezien echter de gegevens der overige auteurs, zou het regulatiemechanisme van luteale activiteit in AC-♂♂ vergelijkbaar geacht kunnen worden met dat van door lactatie onderhouden luteale activiteit in vrouwelijke ratten.

ad d.

ES-VMN leidde niet tot luteale activering bij AC-♂♂ . Dezelfde ingreep leidde wel tot luteale activering bij normale vrouwelijke ratten (Everett & Quinn, 1966) en bij NC-♂♂ (hoofdstuk 5, exp. 4). Dit resultaat ondersteunt de veronderstelling, dat het effect van ES-VMN op luteale activiteit geslachtsverschillend is en afhankelijk van de neonatale aanwezigheid van testishormonen (Zeilmaker et al., 1967).

Het lijkt mogelijk, dat ES-VMN bij vrouwelijke ratten als specifieke, initiërende stimulus van luteale activiteit kan fungeren (Quinn & Everett, 1967). Omtrent het mechanisme zijn geen gegevens bekend, maar het ligt voor de hand om initiatie van luteale activiteit door ES-VMN in verband te brengen met verhoogde afgifte van prolactine onder invloed van deze stimulus. Als dit inderdaad het geval mocht zijn, dan moet uit bovenstaande waarnemingen in AC-♂♂ geconcludeerd worden, dat ES-VMN bij deze dieren niet tot afgifte van luteotroop hormoon leidt. Dit zou impliceren, in aansluiting op eerdere experimenten (hoofdstuk 4; exp. 4), dat geslachtsverschillen met betrekking tot regulatie van gonadotropinesecretie ook binnen de hypothalamus aanwezig zijn; dergelijke verschillen behoeven zich dus in het geheel niet te beperken tot verschillen binnen de *area preoptica*.

Opvallend is echter, dat het geslachtsverschil binnen de *area preoptica* met betrekking tot inductie van ovulatie verdwijnt, indien elektrische of elektrochemische stimulatie wordt toegepast (Quinn, 1966); het geslachtsverschil met betrekking tot secretie van prolactine, waarin de ventromediale hypothalamus mogelijkwijs een belangrijke rol bij zou kunnen spelen, blijft blijkbaar ook bij exogene stimulatie bestaan.

## § 2 *Relatie tussen neonatale differentiatie van het ovulatiemechanisme en mechanismen van regulatie van luteale activiteit.*

De in hoofdstuk 5 en 6 beschreven experimenten bevestigen, dat een aantal aspecten van regulatie van luteale activiteit geslachtsverschillen vertoont (Zeilmaker, 1963). Het lijkt aannemelijk, dat dergelijke geslachtsverschillen op vergelijkbare wijze tot stand komen als de geslachtsverschillen in het ovulatiemechanisme (fig. 1).

Men kan zich afvragen, of de geslachtsverschillen in het ovulatiemechanisme en in de bovenbeschreven aspecten van regulatie van luteale activiteit twee manifestaties zijn van een enkel gebeuren, dat zich in de neonatale periode heeft afgespeeld, of dat ze manifestaties zijn van twee verschillende gebeurtenissen in de neonatale periode.

De experimenten van hoofdstuk 5 en 6 tonen aan, dat de neonatale differentiatie van de aanleg van het ovulatiemechanisme en de differentiatie van regulatiemechanismen van luteale activiteit zowel in *de*

*tijd* (nl. de neonatale levensfase), als wat betreft het *agens* (nl. hormonen uit de neonatale testes) nauw met elkaar verbonden zijn.

Er zijn ook aanwijzingen, dat beide differentiatieprocessen wat betreft de *plaats van werking* ( nl. de *area preoptica* ) met elkaar verwant zijn. Het bleek namelijk, dat onderbreking van de verbindingen tussen de *area preoptica* en de hypothalamus niet alleen het optreden van ovulatie verder verhinderde, maar ook activering van luteale functie door copulatie en onderhoud van door copulatie geïnduceerde luteale activiteit (Arai, 1969; Carrer & Taleisnik, 1970).

De *aard van de processen*, ten aanzien waarvan in beide gevallen de differentiatie optreedt, lijkt echter uiteen te lopen. Inductie van ovulatie en inductie van luteale activiteit lijken in die zin met elkaar vergelijkbaar, dat zij beide onmiddellijke reacties van korte duur op omgevingsstimuli representeren. Onderhoud van luteale activiteit echter wekt meer het idee van een langdurig proces. Ten aanzien van regulatie van ovariumactiviteit lijkt de regulatie van dergelijke 'tonische' processen veeleer gelokaliseerd te zijn buiten die plaatsen, welke een specifieke betekenis bij inductie van ovulatie hebben (Barraclough, 1966). Recente gegevens duiden er echter op, dat onderhoud van luteale activiteit wellicht niet afhankelijk is van continue secretie van prolactine, maar van dagelijks gegenereerde 'surges' van prolactine (Freeman & Neill, 1972). In een andere studie werd aangetoond (Neill, 1972), dat het mechanisme om 'prolactin-surges' te genereren alleen in dieren met een 'vrouwelijk type' ovulatiemechanisme aanwezig was; bovendien bleek het optreden van deze 'surges' afhankelijk van de aanwezigheid van intacte verbindingen tussen de *area preoptica* en de hypothalamus. Het zou dus kunnen zijn, dat het onderhouden van luteale activiteit slechts mogelijk is bij aanwezigheid van een mechanisme, dat in staat is dergelijke plotselinge 'surges' te genereren: aldus lijkt de mogelijkheid aanwezig, dat onderhouden van luteale activiteit afhankelijk is van een *gelijksoortig proces* als dat, waarvan cyclische ovulatie afhankelijk is.

Differentiatie van het ovulatiemechanisme en differentiatie van regulatie van luteale activiteit vertonen derhalve met elkaar duidelijke verwantschap met betrekking tot *tijd van differentiatie*, *agens van de differentiatie*, *plaats van werking van het agens* en *karakter van het differentiërende proces*. Het lijkt verantwoord te veronderstellen, dat deze differentiatieprocessen in feite twee manifestaties zijn van

één gebeuren in de neonatale levensfase.

§ 3 Een 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit in TP- $\frac{\text{oo}}{\text{++}}$  ?

Ofschoon het antwoord op grond van het gestelde in bovenstaande paragraaf bevestigend zou moeten zijn, blijkt het moeilijk dit antwoord op basis van de verkregen gegevens te geven.

De experimenten toonden immers aan, (a) dat luteale activiteit in TP- $\frac{\text{oo}}{\text{++}}$  onder invloed van ectopisch hypofyseweefsel gedurende een kortere periode werd onderhouden dan in AC- $\delta\delta$  en (b) dat luteale activiteit onderhouden kon worden, ook na verwijdering van de ectopische hypofyse.

De geringere duur van luteale fasen in TP- $\frac{\text{oo}}{\text{++}}$  zou echter wellicht kunnen samenhangen met het geringere aantal CL, dat in deze dieren gevormd wordt na ECS-POA, vergeleken met AC- $\delta\delta$  (tabel 3). Ten aanzien van (b) lijkt het, mede op grond van de resultaten in experiment 1, niet waarschijnlijk dat prolactinesecretie onder invloed van de luteale activiteit werd getriggerd; het heeft er veeleer de schijn van, dat in deze TP- $\frac{\text{oo}}{\text{++}}$  een voortdurende secretie van prolactine plaatsvond.

Voorts is in het verleden aangetoond, zoals in de inleiding werd vermeld, dat vaginale stimulatie niet tot CL-activering leidde bij TP- $\frac{\text{oo}}{\text{++}}$  en ES-VMN evenmin (Zeilmaker, 1964; Zeilmaker et al., 1967).

Het lijkt dan ook verantwoord te concluderen, dat TP- $\frac{\text{oo}}{\text{++}}$  een 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit vertonen; de specifieke situatie echter in deze dieren, te weten spontane prolactinesecretie en een kleiner aantal CL dan in AC- $\delta\delta$ , zorgt er voor dat dit 'mannelijk type' zich niet onder alle experimentele omstandigheden als zodanig manifesteert.

#### SAMENVATTING

1. CL, welke door ECS-POA in ovariumtransplantaten in AC- $\delta\delta$  zijn geïnduceerd, vertonen spontaan geen luteale activiteit; de structurele luteolyse van deze CL verloopt tenminste in grote trekken op gelijke wijze als in cyclische vrouwelijke ratten.



2. Op verscheidene wijzen kan functionele activiteit van door ECS-POA geïnduceerde CL in AC-♂♂ tot stand gebracht worden. ES-VMN is echter geen effectieve stimulus om luteale activiteit te induceren.
  
3. Luteale activiteit in AC-♂♂ , onderhouden door ectopisch hypofyseweefsel, houdt gedurende een niet-gedefiniëerde periode aan; de duur van deze periode is in sterke mate afhankelijk van de hoeveelheid ectopisch aanwezig hypofyseweefsel.  
Luteale activiteit onder invloed van ectopisch hypofyseweefsel wordt waarschijnlijk uitsluitend onderhouden door prolactine uit de ectopische hypofyse en houdt derhalve onmiddellijk op na verwijdering van de ectopische hypofyse.
  
4. De onder 2. en 3. genoemde kenmerken van luteale activiteit in AC-♂♂ zijn verschillend van die in normale vrouwelijke ratten. Deze verschillen zijn waarschijnlijk een manifestatie van hetzelfde effect van neonatale testishormonen als de afwezigheid van spontane ovulatie in ovariumtransplantaten in deze dieren.
  
5. TP-♀♀ hebben een 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit. In experimentele situaties kan deze hoedanigheid echter versluierd worden doordat enerzijds de grootte van een generatie CL in TP-♀♀ kleiner is dan die in AC-♂♂ , en anderzijds TP-♀♀ spontane prolactineproductie kunnen vertonen.

HOOFDSTUK 7 : VERGELIJKING VAN HET OVULATIEMECHANISME VAN AC-♂♂ MET  
DAT VAN ANOVULATOIRE NC-♂♂

INLEIDING

In het door Pfeiffer ontworpen concept van de geslachtsdifferentiatie van de aanleg van het ovulatiemechanisme bij de rat werd de neonatale levensfase als de fase van *irreversibele differentiatie* aangeduid (figuur 1). De veronderstelling was, dat in deze periode onherroepelijk werd beslist, of op volwassen leeftijd cyclische ovulatie op zou treden of niet.

Enkele jaren na Pfeiffer's publikatie werd echter beschreven, dat cyclische ovulatie in vrouwelijke ratten van een bepaalde stam reeds op vroege leeftijd stopte (Everett, 1939). Ophouden van cyclische ovariumactiviteit bleek een algemeen voorkomend verschijnsel te zijn in oude ('seniele') vrouwelijke ratten (Wolfe et al., 1940; Mandl, 1961; Aschheim, 1964/65; Zeilmaker, 1969; Clemens et al., 1969). Dergelijke 'seniele' vrouwelijke ratten vertoonden eenzelfde ovariummorfologie als TP-♀♀: ovulatie kon bij dergelijke dieren op verscheidene wijzen worden geïnduceerd (Aschheim, 1966; Clemens et al., 1969). Dergelijke dieren konden na éénmalige inductie van ovulatie opnieuw cyclische ovulatie vertonen (Aschheim, 1966; 1970).

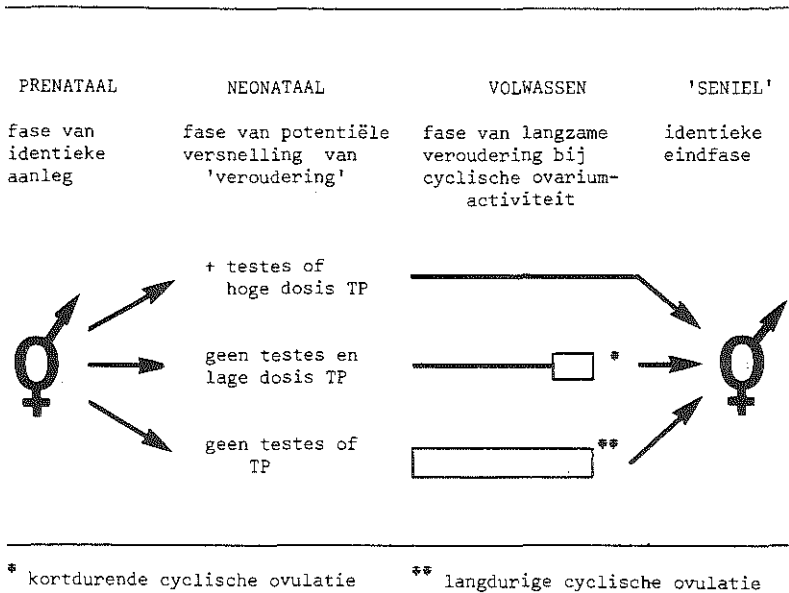
Swanson & Van der Werff ten Bosch (1964a) beschreven, dat vrouwelijke ratten, die neonataal met een kleine dosis TP waren behandeld, na de puberteit gedurende een korte periode cyclische ovariumactiviteit vertoonden. De duur van deze periode was omgekeerd evenredig met de hoeveelheid neonataal geïnjecteerd TP; na injectie van 50 µg TP of meer werd in het geheel geen cyclische ovariumactiviteit meer waargenomen. Na de korte periode met cyclische ovariumactiviteit vertoonden de dieren anovulatoire ovaria, karakteristiek voor het door een hoge dosis TP veroorzaakte 'early-androgen syndrome'.

Het is niet gemakkelijk deze waarnemingen in te passen in het genoemde concept van *irreversibele differentiatie* van de aanleg van het ovulatiemechanisme in de *neonatale levensfase*.

Swanson & Van der Werff ten Bosch (1964a) en Van der Werff ten Bosch et al. (1971) probeerden de waarnemingen van Pfeiffer en de

bovengenoemde waarnemingen in een ander schema te verenigen (figuur 12). Daarin werd eveneens uitgegaan van een in de prenatale fase *identieke aanleg* van het ovulatiemechanisme in mannelijke en vrouwelijke dieren. Verondersteld werd, dat deze identieke aanleg zich op twee manieren kon ontwikkelen tot een in mannelijke en vrouwelijke dieren *identieke eindfase*: deze eindfase werd dan gekenmerkt door *afwezigheid van spontane ovulatie*. Cyclische ovulatie zou derhalve mogelijk zijn tot op het moment, waarop de eindfase in de ontwikkeling was bereikt.

Figuur 12 : Het ovulatiemechanisme van ratten in verschillende levensfasen, volgens Swanson & Van der Werff ten Bosch (1964).



De eindfase kon in deze modelvoorstelling ófwel snel in de neonatale levensfase bereikt worden onder invloed van testishormonen, c.q. injectie van TP; ófwel langzaam in de volwassen levensfase onder invloed van cyclische ovariumactiviteit, c.q. blootstelling aan oestrogene hormonen (Kawashima, 1960).

In deze veronderstelling zijn de effecten van neonatale testishormonen op het ovulatiemechanisme derhalve dezelfde als die van cycli-

sche ovulatie op volwassen leeftijd; deze laatste effecten komen echter in een veel langzamer tempo tot stand. Een kortdurende periode met cyclische ovariumactiviteit, zoals waargenomen na neonatale injectie van 5 µg TP, kon verklaard worden door aan te nemen, dat de ontwikkeling naar de eindfase in twee gedeelten verlopen kon: gedeeltelijk in de neonatale periode onder invloed van een voor vermannelijking subliminale dosis TP en gedeeltelijk in de volwassen levensfase onder invloed van een korte periode met cyclische ovariumactiviteit (figuur 12).

In de volgende experimenten zal getracht worden de voornoemde veronderstelling te toetsen; met name zal worden nagegaan welke factoren een rol spelen bij het ophouden van cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂; nagegaan zal worden, in hoeverre dergelijke factoren waarschijnlijk in het CZS gelokaliseerd zijn, zoals dat met effecten van neonataal TP het geval is (exp. 1-4).

Een onmiddellijke gevolgtrekking uit het bovengenoemde model is, dat het ovulatiemechanisme van anovulatoir geworden NC-♂♂ gemeenschappelijke kenmerken moet hebben met het ovulatiemechanisme van AC-♂♂, die afwijkend zijn van die in normale vrouwelijke ratten. Dit zal worden onderzocht door het effect te analyseren van progesteroninjectie, ECS-AME en van eenmalige inductie van ovulatie in AC-♂♂ en anovulatoir geworden NC-♂♂. Van progesteroninjectie en ECS-AME is in het verleden gebleken, dat bij dieren met een 'vrouwelijk type' ovulatiemechanisme wél, bij dieren met een 'mannelijk type' niet ovulatie en CL-vorming daar het gevolg van kan zijn (Zeilmaker, 1966; Barraclough, 1966; Bunn & Everett, 1957; Arai, 1971). Eenmalige inductie van ovulatie in anovulatoire dieren met een 'vrouwelijk type' ovulatiemechanisme kan door meerdere ovulaties gevolgd worden (Aschheim, 1966), bij dieren met een 'mannelijk type' niet (Yazaki, 1959).

#### MATERIAAL EN METHODEN

De experimentele technieken, welke bij deze experimenten werden gebruikt, werden reeds in vorige hoofdstukken beschreven.

## RESULTATEN

*exp. 1 De duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ met twee verschillende typen van ovariumactiviteit.*

De duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit werd onderzocht bij NC-♂♂ met ófwel uitsluitend 5-daags cyclische ovariumactiviteit, ófwel met luteale activiteit naast 5-daags cyclische ovariumactiviteit.

Zoals reeds besproken in hoofdstuk 4 (exp. 1-3) hield cyclische ovariumactiviteit bij 15 (RU)NC-♂♂ met uitsluitend 5-daags cyclische ovariumactiviteit gedurende 2-4 maanden aan; daarentegen hield deze

*Tabel 16 : Duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ in relatie tot optreden van luteale activiteit.*

---

	duur in maanden	aantal cycli	aantal luteale fasen
15 (RU)NC-♂♂ met uitsluitend 5-daagse cycliciteit	2 - 4	9 - 20	0
13 (RU)NC-♂♂ met luteale fasen onder invloed van ectopisch hypofyseweefsel	meer dan 4	----	----
24 (R)NC-♂♂ met spontane luteale fasen	3.5 - 14	10 - 22	1 - 12

---

bij 24 (R)NC-♂♂ , waarin ook spontane luteale activiteit voorkwam, gedurende  $3\frac{1}{2}$ -14 maanden aan. In beide groepen was het aantal cycli in deze perioden van zeer verschillende lengte ongeveer gelijk (tabel 16).

Verondersteld zou kunnen worden, dat het optreden van anovulatie in (R)NC-♂♂ vooral werd uitgesteld ten gevolge van het optreden van luteale activiteit bij deze dieren. Om deze veronderstelling te toetsen werd de duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit onderzocht bij 13 (RU)NC-♂♂, waarin opvolgende fasen met luteale activiteit voorkwamen onder invloed van ectopisch hypofyseweefsel. Twaalf van deze dieren vertoonden 4 maanden na ovarium-implantatie nog cyclische ovariumactiviteit (tabel 16).

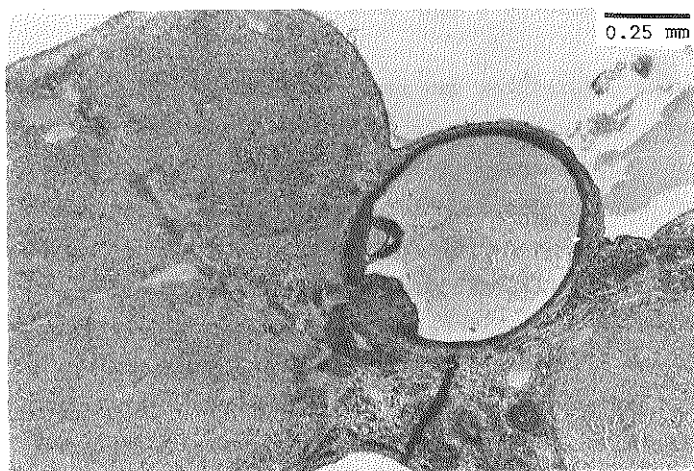
Vervolgens werden gegevens van die 6 (R)NC-♂♂, waarbij de duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit het kortst was geweest, vergeleken met overeenkomstige gegevens van die 6 dieren, waarbij cyclische ovariumactiviteit het langst had aangehouden. De vergelijking

*Tabel 17 : Vergelijking van gegevens omtrent de duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit van (R)NC-♂♂.*

	gemiddelde duur in maanden	gemiddeld aantal cycli	gemiddeld aantal luteale fasen
de 6 (R)NC-♂♂ met de kortste periode	4	11	2
de 6 (R)NC-♂♂ met de langste periode	12	17	10
verschil in maanden	8	1	7

wees uit (tabel 17), dat verlenging van de periode met cyclische ovariumactiviteit in (R)NC-♂♂ voornamelijk het gevolg was van toename van het aantal luteale fasen.

Geconcludeerd wordt, dat het aantal ovulaties in cyclische NC-♂♂



*Figuur 11 : Ovariummorfologie op dioestrus-1 van een 'anovulatoire cyclus' in NC-88 .*

Op de foto is één van de 13 in het ovarium aanwezige atretische follikels afgebeeld, alsmede atrofiërende CL, welke in de vorige cyclus werden gevormd. In de follikel bevindt zich nog een niet-gerijpte oöcyt: de nucleolusmembraan ('germinal vesicle') is zichtbaar in de kern. Onder de cumulus oophorus is een groepje geluteïniseerde thecacellen zichtbaar.

beperkt is. Dit aantal lijkt tamelijk onafhankelijk van de duur van het interval, waarmee ovulaties op elkaar volgen.

*exp.2 Ovariummorfologie van NC-♂♂ in relatie met de overgang van cyclische ovariumactiviteit naar anovulatie.*

Dagelijkse vagina-uitstrijken van zowel (RU)- als (R)NC-♂♂ wezen uit, dat de overgang van vaginale cycliciteit naar permanente cornificatie meestal plotseling, onherroepelijk en in ieder geval niet voorspelbaar plaatsvond. Het was dan ook niet mogelijk om op basis van vagina-uitstrijken ovaria te selecteren van dieren, die in de overgangsfase van cyclische ovariumactiviteit naar anovulatie waren.

Om te onderzoeken, of verschijnselen in ovariummorfologie gecorreleerd konden worden met een naderend ophouden van cyclische ovariumactiviteit, leek geen andere mogelijkheid aanwezig dan nauwkeurige bestudering van alle in de loop der experimenten verzamelde ovariumtransplantaten van NC-♂♂ . De gedachte was hierbij, dat het op deze wijze wellicht mogelijk was om boven bedoelde verschijnselen te ontdekken bij toeval: met name immers bij (RU)NC-♂♂ was de totale duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit gering en de kans wellicht aanwezig, dat ovaria juist in de overgangperiode naar anovulatie verwijderd waren.

Analyse van meer dan 100 transplantaten wees uit, dat verreweg de meeste geen verschijnselen vertoonden, die afweken van het in hoofdstuk 4 beschreven normale patroon voor ovariummorfologie van cyclische en anovulatoire NC-♂♂ . Aldus werd het aan dagelijkse vagina-uitstrijken verkregen vermoeden bevestigd, dat de overgang van cyclische ovariumactiviteit naar anovulatie een plotselinge overgang moest zijn.

Er waren echter 9 ovaria, die een van het normale patroon afwijkend beeld vertoonden. De ovaria waren afkomstig van (RU)- en (R)NC-♂♂ op de oestrusdag (2 x), eerste dioestrusdag (4 x) en tweede dioestrusdag (3 x). In plaats van postovulatoire follikels, resp. pasgevormde CL, was een 'generatie' atretische follikels aanwezig (figuur 11), gekenmerkt door een atrofiërende granulosawand en -tenminste op de oestrusdag- door de aanwezigheid van niet-gerijpte oöcyten.

Atresie van follikels was in geen van deze 9 ovaria gedurende de vorige cyclus opgetreden: de morfologie van CL wees uit, dat normale transformatie naar niet-functionele CL had plaatsgevonden. Ook



bij geen der andere ovariumtransplantaten was dergelijke atresie in de voorlaatste cyclus opgetreden.

Geconcludeerd wordt, dat ovariumtransplantaten in NC-♂♂ een laatste 'cyclus' kunnen ondergaan, waarin atresie van een generatie follikels optreedt in plaats van transformatie naar CL. Deze laatste 'cyclus' gaat waarschijnlijk tenminste in een aantal NC-♂♂ onmiddellijk aan anovulatie vooraf.

*exp.3 Cyclische ovariumactiviteit na ovariumimplantatie op verschillende leeftijden.*

Om te onderzoeken, of de leeftijd van NC-♂♂ bij ovariumimplantatie van invloed was op het optreden van cyclische ovariumactiviteit, werden

*Tabel 18 : Cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ na ovarium-implantatie op verschillende leeftijden.*

---

	(RU)NC-♂♂	(R)NC-♂♂
leeftijd bij implantatie 30-90 dagen	59 / 65*	39 / 39
leeftijd bij implantatie 120-240 dagen	13 / 36	22 / 43
leeftijd bij implantatie 240-360 dagen	2 / 20	----

---

\*aantal dieren met spontane cyclische ovariumactiviteit / aantal onderzochte dieren.

gegevens van controledieren van alle experimenten verzameld. Het bleek, dat cyclische ovariumactiviteit was opgetreden bij vrijwel alle dieren, waarbij implantatie op een leeftijd van 30-90 dagen had plaatsgevonden.

Na implantatie op oudere leeftijd was bij minder dan de helft van de dieren spontane cycliciteit waargenomen (tabel 18).

Ook werd bij deze dieren de duur van het interval bestudeerd tussen ovariumimplantatie en eerste ovulatie (tabel 19). Bij

*Tabel 19 : Duur van de periode tussen ovariumimplantatie en eerste ovulatie in (RU)- en (R)NC-♂♂ in relatie tot de leeftijd bij ovariumimplantatie.*

aantal dieren	leeftijd bij implantatie in dagen	duur 12 - 19 dagen	duur 20 - 45 <sup>*</sup> dagen
36 (RU)NC-♂♂	30 - 90	36 / 36	0 / 36
13 (RU)NC-♂♂	120 - 360	23 / 23	0 / 23
26 (R)NC-♂♂	30 - 60	25 / 26	1 / 26
22 (R)NC-♂♂	120 - 240	9 / 22	13 / 22

\* na 45 dagen werden dergelijke observaties gestaakt.

(RU)NC-♂♂ bleek dit interval onafhankelijk van de leeftijd bij implantatie en bedroeg 12-19 dagen. Bij (R)NC-♂♂ daarentegen was het interval langer bij 13/22 dieren, waarbij implantatie op een leeftijd van meer dan 100 dagen was uitgevoerd: de duur van deze periode kon tot meer dan 40 dagen zijn.

Bij de niet-ovulerende dieren, die permanente vaginale cornificatie vertoonden, werd onderzocht of deze in staat waren om cyclische ovariumactiviteit te onderhouden. Ovulatie en CL-vorming werd bij 11 dieren eenmalig geïnduceerd met 10 eenheden HCG. Bij 9/11 werd deze eerste ovulatie gevolgd door een periode met cyclische ovariumactiviteit.

Geconcludeerd wordt, dat veroudering van NC-♂♂ een invloed heeft op het optreden van cyclische ovariumactiviteit na ovariumimplantatie. Veroudering van (R)NC-♂♂ heeft ook een invloed op de duur van het interval tussen ovariumimplantatie en eerste ovulatie bij deze dieren.

Niet-spontaan ovulerende dieren kunnen echter wél cyclische ovariumactiviteit onderhouden, als ovulatie éénmalig onder invloed van exogene stimulatie tot stand wordt gebracht.

*exp.4 Cyclische ovariumactiviteit na langdurige voorbehandeling met oestradiol-benzoaat.*

Aan 33 (R)NC-♂♂ werd gedurende 6 - 9 weken 25-50 µg OB per week gegeven. Aan 27 controledieren werd alleen het oplosmiddel van OB gegeven. De leeftijd van de dieren bij het begin van de injecties was 100-140 dagen.

Vaginatransplantaten in met OB behandelde dieren vertoonden tot 2.5 week na de laatste injectie tekenen van oestrogene stimulatie.

Bij alle dieren werd 2 - 5 weken na de laatste injectie een ovarium geïmplanteed. Cyclische ovariumactiviteit werd bij 14/27 controledieren waargenomen en slechts bij 5 /33 met OB behandelde dieren.

Om te onderzoeken, of niet-spontaan ovulerende, met OB voorbehandelde dieren cyclische ovariumactiviteit konden onderhouden, werd het effect onderzocht van éénmalige inductie van ovulatie in deze dieren. Ovulatie kwam bij alle 6 onderzochte dieren tot stand onder invloed van reacties van bronstgedrag, die de dieren bij blootstelling aan stimulus-♂♂ vertoonden. Deze eerste, aldus geïnduceerde ovulatie werd bij alle 6 dieren gevolgd door cyclische ovulatie.

Geconcludeerd wordt, dat langdurige voorbehandeling van NC-♂♂ de kans verkleint, dat deze dieren na implantatie van een ovarium cyclische ovulatie zullen vertonen. Niet-spontaan ovulerende dieren kunnen echter wel cyclische ovulatie onderhouden, als ovulatie door exogene stimulatie éénmalig tot stand is gebracht.

*exp.5 Vergelijking van het ovulatiemechanisme van AC-♂♂ met dat van anovulatoir geworden NC-♂♂ .*

### 5.1 Effect van éénmalige injectie van 2.5 mg progesteron.

Het effect van een éénmalige injectie met progesteron werd onderzocht bij 14 anovulatoire NC-♂♂ en 25 AC-♂♂ . Bij afwezigheid van CL-vorming onder invloed van deze injectie werd een tweede injectie 8 - 10 dagen na de eerste gegeven.

Injectie van progesteron werd bij 8 /14 NC-♂♂ en bij 0 /25 AC-♂♂ gevolgd door CL-vorming.

### 5.2 Effect van ECS-AME.

Het effect van ECS-AME werd onderzocht bij 12 anovulatoire NC-♂♂ en 6 AC-♂♂ .Unilaterale stimulatie leidde bij 10/12 NC-♂♂ tot CL-vorming en bij 0 / 6 AC-♂♂ .

### 5.3 Effect van éénmalige inductie van ovulatie.

Zoals eerder beschreven was éénmalige inductie van ovulatie in anovulatoire NC-♂♂ voldoende om een periode met cyclische ovulatie te initiëren.

Eenmalige inductie van CL-vorming bij AC-♂♂ met behulp van HCG of door ECS-POA werd nooit gevolgd door nieuwe ovulaties.

Geconcludeerd wordt, dat het ovulatiemechanisme van anovulatoire NC-♂♂ verschilt van dat van AC-♂♂ met betrekking tot het effect van progesteron, ECS-AME en met betrekking tot de mogelijkheid van onderhouden van cyclische ovariumactiviteit.

## DISCUSSIE

§ 1 : *Aard en mogelijke lokalisatie van de factoren, die de duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ bepalen.*

Een drietal factoren bleek een belangrijke invloed te hebben op het optreden, c.q. voortzetten van cyclische ovariumactiviteit: (1) het aantal voorafgaande cycli, (2) voorbehandeling met OB en (3) de

leeftijd bij ovariumimplantatie.

(1) *het aantal voorafgaande cycli.*

Waarnemingen aan cyclische ovariumactiviteit in NC- $\delta\delta$  met en zonder luteale fasen suggereerden, dat het aantal cycli in deze dieren constant was; de duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit bleek langer, als de duur van de periode tussen opvolgende ovulaties ten gevolge van luteale activiteit langer was. Dit verschijnsel zou verklaard kunnen worden door aan te nemen, dat per ovulatie zodanige veranderingen in het regulatiemechanisme van cyclische ovariumactiviteit worden teweeggebracht, dat de omstandigheden voor het optreden van volgende ovulaties minder worden. Aangezien het regulatiemechanisme van cyclische ovulatie in normale vrouwelijke ratten waarschijnlijk een hoge overtolligheidsgraad bezit (Brown-Grant 1971), is het niet noodzakelijk, dat onder minder optimale omstandigheden het onderhouden van 'normale', 5-daagse cycliciteit verstoord is.

Het cumulatieve effect echter van veranderingen, teweeggebracht door een aantal ovulaties zou echter zodanig kunnen zijn, dat op zeker moment een grens wordt overschreden, voorbij welke onderhoud van cyclische ovariumactiviteit niet meer mogelijk is.

Gorski (1968) visualiseerde een dergelijke veronderstelling in neonataal met een kleine dosis TP behandelde vrouwelijke ratten. Hij stelde, dat dergelijke dieren nog slechts een beperkte 'ovulatiecapaciteit' hadden, die door achtereenvolgens optredende ovulaties geleidelijk, doch systematisch zou worden uitgeput. Andere auteurs hanteerden een soortgelijke voorstelling van zaken (Kikuyama & Kawashima, 1966; Arai, 1971). Op grond van experimenten van Kawashima (1960) werd bovendien gesuggereerd, dat oestrogene ovariumhormonen het eigenlijke 'uitputtende' agens waren. Opvallend was overigens, dat ovulaties in dergelijke dieren ófwel met de normale, strakke 4/5-daagse regelmaat plaatsvonden ófwel in het geheel niet (Gorski, 1968; exp. 2 hoofdstuk 7). 'Uitputting' van de ovulatiecapaciteit leek derhalve een zeer systematisch, geordend gebeuren, in tegenstelling tot hetgeen eerder was gesuggereerd (Gorski & Barraclough, 1963).

Dat het aantal cycli en niet zozeer de duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit de beperkende factor was voor voortgang van cyclische ovariumactiviteit, werd eveneens gesuggereerd door resultaten van Mandl (1961). Deze auteur beschreef, dat cyclische ovariumactiviteit in nullipare ratten, die nooit luteale activiteit hadden doorgemaakt, eerder ophield dan in multipare ratten, die langdurige perioden met

luteale activiteit gedurende zwangerschap en lactatie hadden doorge-  
maakt.

Dat blootstelling aan ovariumhormonen en niet slechts veroudering  
de limiterende factor was, bleek uit waarnemingen, dat (RU)NC-♂ na  
ovariumimplantatie op een leeftijd van 200 dagen cyclische ovariumac-  
tiviteit konden vertonen: in dieren, waarbij ovariumimplantatie op  
een leeftijd van 30 dagen had plaatsgevonden, was cyclische ovarium-  
activiteit op een dergelijke leeftijd allang gestopt.

(2) *voorbehandeling met OB.*

In bovengenoemde experimenten van Kawashima (1960), Kikuyama &  
Kawashima (1966) en Arai (1971) werd gesuggereerd, dat ovariumhor-  
monen bij uitstek het 'uitputtende' agens waren van 'ovulatiecapaciteit'.

Het resultaat van experiment 4 ondersteunt deze idee slechts  
ten dele. Het aantal met OB voorbehandelde dieren, dat cyclische ovarium-  
activiteit vertoonde, was inderdaad geringer dan het aantal controle-  
dieren. De duur van blootstelling aan oestrogene hormonen was echter  
tenminste ongeveer gelijk aan de duur van blootstelling aan oestrogene  
hormonen gedurende 20 cycli (OB-injecties gedurende 56-77 dagen effec-  
tief; oestrogene hormonen per cyclus 3 dagen aanwezig). Het maximaal  
waargenomen aantal cycli in NC-♂, waarbij ovariumimplantatie op  
vroeg leeftijd werd uitgevoerd, bedroeg 22 (tabel 16). Voorts was  
slechts 50 % van de dieren van de controlegroep spontaan cyclisch. In  
het licht van de door Kawashima e.a. geopperde veronderstelling was  
het dus minder verwacht, dat nog 5/33 met OB behandelde dieren spontaan  
cyclische ovariumactiviteit vertoonden. Tevens bleek, dat niet-spontaan  
cyclische dieren toch nog cyclische ovariumactiviteit konden onder-  
houden, als ovulatie éénmalig door exogene stimulatie werd geïnduceerd.

Het lijkt dan ook niet waarschijnlijk, dat blootstelling aan  
oestrogene hormonen de limiterende factor bij uitstek is van cyclische  
ovariumactiviteit in NC-♂. Andere factoren moeten in dit ophouden e-  
veneens een belangrijke rol spelen.

(3) *de leeftijd bij implantatie.*

Experiment 3 wees uit, dat cyclische ovariumactiviteit in NC-♂  
minder voorkwam, als ovariumimplantatie pas op latere leeftijd ge-  
schiedde. Blijkbaar werden bij veroudering van de dieren, ook zonder  
de aanwezigheid van ovariumweefsel, de omstandigheden voor inductie  
van ovulatie minder gunstig. In de bestaande literatuur omtrent de re-  
latie van veroudering en cyclische ovariumactiviteit

in ratten werd dit effect van veroudering op ovariumactiviteit nog niet beschreven. Harris (1964) concludeerde uit experimenten, die echter niet op vergelijkbare schaal werden uitgevoerd, dat de leeftijd bij implantatie geen effect had op het optreden van cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ .

*Mogelijke lokalisatie van bovengenoemde limiterende factoren van cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ .*

Opmerkelijk was, dat in de laatste experimenten niet-spontaan ovulerende dieren wél cyclische ovulatie en CL-vorming konden onderhouden, als ovulatie éénmalig door exogene stimulatie was geïnduceerd. Het leek er op, dat het ovulatiemechanisme in dergelijke dieren wel in staat was om cyclische ovariumactiviteit te onderhouden, maar dat het mechanisme in de periode vóór exogene stimulatie niet werd geactiveerd. Aangezien het ovulatiemechanisme na de geïnduceerde ovulatie wél werd geactiveerd, zou verondersteld kunnen worden dat het secretiepatroon van ovariumhormonen na de geïnduceerde ovulatie voldoende was om het ovulatiemechanisme te activeren, terwijl de continue secretie van oestrogene hormonen door het 'polyfolliculaire' ovarium vóór de geïnduceerde ovulatie hiertoe niet voldoende was.

Met name zou verondersteld kunnen worden, dat in de omstandigheden na de geïnduceerde ovulatie de hormoonsecretie van de niet-functionele CL, die vóór ovulatie ten enenmale ontbrak, van kritiek belang was voor het induceren van de volgende ovulatie.

Het is aannemelijk gemaakt, dat degenererende CL op de ochtend van pro-oestrus verhoogde secretorische activiteit vertonen, voorafgaand aan de ovulatoire hormoonafgifte (Everett, 1945); het zou kunnen zijn, dat onder bepaalde omstandigheden dergelijke hormonen -waarschijnlijk progesteron- bij inductie van ovulatie een rol spelen (Zeilmaker, 1966; Feder et al., 1971; Nequin & Schwartz, 1971).

Het lijkt niet eenvoudig om een 'primaire oorzaak' vast te stellen voor een dergelijke klaarblijkelijk falende interactie tussen bij inductie van ovulatie betrokken elementen in NC-♂♂ . Bovenstaande argumenten doen vermoeden, dat het ovarium zelf bij deze falende interactie van beslissende betekenis kan zijn, nl. door de afwezigheid van CL. Er zijn echter met name vooralsnog geen zwaarwegende argumenten aan te voeren, dat het 'primaire falen' zich afspeelt op het niveau van het CZS, zoals gesuggererd werd door Aschheim (1964/65).

Daarin onderscheidt zich dan ook anovulatie als 'ouderdomsverschijnsel' van anovulatie na neonatale blootstelling aan testishormonen; van dit laatste is overtuigend aangetoond, dat het 'primaire falen' zich wél op het niveau van het CZS afspeelt.

§ 2 : *Mogelijke loop van gebeurtenissen bij het ophouden van cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ .*

Dagelijkse vagina-uitstrijken van NC-♂♂ wezen uit, dat de overgang van cyclische ovariumactiviteit naar anovulatie plotseling en onherroepelijk was. De onvoorspelbaarheid van het optreden van anovulatie maakte een omslachtige procedure noodzakelijk om na te gaan, of wellicht verschijnselen in de ovariummorfologie gecorreleerd konden worden met het naderend optreden van anovulatie.

De 9 ovaria met een generatie atretische follikels in plaats van postovulatoire follikels of pasgevormde CL, maakten waarschijnlijk de laatste 'cyclus' voorafgaand aan anovulatie door. Het valt uit deze gegevens uiteraard niet te zeggen, of bij alle dieren een dergelijke 'cyclus' voorafgaand aan anovulatie op zal treden.

Het lijkt aannemelijk, dat de 'cyclus' met atretische follikels een 'mislukte ovulatiecyclus' is, welke veroorzaakt wordt, doordat een te geringe hoeveelheid gonadotropine voor ovulatie wordt afgescheiden. De reden voor deze aanname is gelegen in het feit, dat preovulatoire follikels onder invloed van blootstelling aan een subovulatoire hoeveelheid, exogeen toegediend gonadotropine atretisch kunnen worden (Vermeiden, ongepubl.). Bovendien zijn verscheidene gevallen in de literatuur beschreven, waarin atresie van een gehele generatie preovulatoire follikels geassocieerd kan worden met blootstelling aan een subovulatoire hoeveelheid gonadotropine (Wolfe et al., 1940: 'anovulatoire cycli' in seniele vrouwelijke ratten; Everett, 1967: atresie van een generatie preovulatoire follikels bij 50 % van de onderzochte dieren na copulatie; bij de overige 50 % had copulatie geleid tot ovulatie; Quinn & Everett, 1967: atresie van een generatie follikels na ES-VMN, welke stimulus waarschijnlijk leidt tot geringe afgifte van gonadotropine -Clemens et al., 1971-; Lawton & Schwartz, 1967: atresie van een generatie follikels op het verwachte tijdstip van inductie van ovulatie bij cyclische, aan constant licht blootgestelde vrouwelijke ratten).



Atresie van een generatie follikels onder invloed van een subovulatoire hoeveelheid gonadotropine onderscheidt zich van een dergelijk proces bij follikelveroudering: terwijl in de genoemde experimentele situaties atresie optreedt op een verwacht tijdstip van ovulatie, treedt atresie als ouderdomsverschijnsel pas verscheidene dagen na het verwachte moment van ovulatie op (Everett & Sawyer, 1950).

Het zou dan ook kunnen zijn, dat anovulatie van NC- $\delta\delta$  een aanvang neemt, als door een samenloop van omstandigheden een voor inductie van ovulatie onvoldoende hoeveelheid gonadotropine wordt afgescheiden. Dit heeft follikelatresie tot onmiddellijk gevolg. Een verder verwijderd gevolg is, dat bij de voorbereiding van het activeren van het ovulatiemechanisme voor de volgende ovulatie degenererende CL ontbreken; zoals beargumenteerd in de vorige paragraaf zou het mogelijk zijn, dat dergelijke CL van kritiek belang zijn bij activering van het ovulatiemechanisme. Uitblijven van activering van het ovulatiemechanisme heeft dan het optreden van de anovulatoire conditie met permanente vaginale cornificatie automatisch tot gevolg.

§ 3 : *Vergelijking van het ovulatiemechanisme van AC- $\delta\delta$  en anovulatoire NC- $\delta\delta$  .*

De resultaten van experiment 5 toonden aan, dat het ovulatiemechanisme van anovulatoire NC- $\delta\delta$  kwalitatief niet verschillend was geworden van dat van vrouwelijke ratten in een van de bestudeerde reacties; de oorspronkelijk aanwezige verschillen met dat van AC- $\delta\delta$  waren blijkbaar gebleven. Deze experimenten doen dan ook geenszins vermoeden, dat blootstelling van het ovulatiemechanisme in de volwassen levensfase aan ovariumhormonen eenzelfde effect heeft als blootstelling aan testishormonen in de neonatale fase.

Veeleer lijkt het ovulatiemechanisme van NC- $\delta\delta$  blijvend verschillend van dat van AC- $\delta\delta$  ; de toestand van anovulatie in NC- $\delta\delta$  wordt waarschijnlijk door andere factoren veroorzaakt dan die bij AC- $\delta\delta$  . De toestand van anovulatie in NC- $\delta\delta$  doet zich voor als die, waarbij door het ontbreken van goed samenspel tussen ieder voor zich competente elementen voor onderhouden van cyclische ovariumactiviteit in CZS, hypofyse en ovarium, ovulatie achterwege blijft. Er is

daarentegen overtuigend aangetoond, dat het CZS onder invloed van blootstelling aan testishormonen in de neonatale levensfase blijvend incompetent wordt om cyclische ovulatie te onderhouden.

#### SAMENVATTING

1. Er zijn waarschijnlijk verscheidene limiterende factoren voor het optreden c.q. onderhouden van cyclische ovariumactiviteit in NC- $\delta\delta$  zoals (1) het aantal ovulaties, (2) de duur van de periode van blootstelling aan ovariumhormonen en (3) de leeftijd. Of cyclische ovulatie op zal treden, c.q. voort zal gaan, hangt waarschijnlijk af van een moeilijk te definiëren complex van factoren.
2. Aan het ophouden van cyclische ovulatie in NC- $\delta\delta$  gaat waarschijnlijk een 'anovulatoire cyclus' vooraf: hierin treedt atresie van een generatie follikels op in plaats van transformatie naar CL. Dit verschijnsel komt waarschijnlijk tot stand doordat een te geringe hoeveelheid gonadotropine voor ovulatie wordt afgescheiden.
3. Het ovulatiemechanisme van anovulatoire NC- $\delta\delta$  vertoont kwalitatief geen verschil met dat van vrouwelijke ratten met betrekking tot het effect van progesteron, ECS-AME en eenmalige inductie van ovulatie. Deze waarnemingen ondersteunen de veronderstelling, dat de neonatale levensfase van ratten een fase van *irreversibele differentiatie* is. Anovulatie als 'ouderdomsverschijnsel' van ratten wordt vermoedelijk veroorzaakt door gebrekkig samenspel tussen de bij inductie van ovulatie betrokken elementen in CZS, hypofyse én ovarium.

## SUMMARY

The main purpose of the experiments described in this thesis was to collect some detailed data concerning sexual differentiation of mechanisms regulating the secretion of gonadotropin in the rat. In the general introduction (*chapter 1*) a general survey of the concept of this sexual differentiation, based mainly on experiments by Pfeiffer (1936), is given. The literature concerning five aspects of this process is reviewed: (1) testosterone as the possible effective agent of neonatal testes for 'masculinization' of gonadotropin secretion; (2) the duration of the neonatal 'critical period' for differentiation of gonadotropin secretion; (3) the minimal period of exposure to neonatal testicular function which is effective for establishing the 'male pattern' of gonadotropin secretion; (4) the site of action of neonatal testosterone, and (5) more recent methods of establishing sexual differences in gonadotropin secretion.

In *chapter 2* the two aims of this thesis were formulated. The first was to gain insight into details of ovarian activity in neonatally castrated male rats (NC-males); the second was to gather information concerning sexual differentiation and the regulation of luteal activity.

The main technique used in this study was evaluated in *chapter 3*. In this chapter experiments were described which indicated that daily smears from vaginal grafts could be used as an indicator of ovarian activity; however it was acknowledged that grafted vaginal tissue showed some differences from *in situ* vaginal tissue. The most interesting difference was that leucocytes were never present in the epithelium of vaginal tissue under the kidney capsule during any stage of the ovarian cycle.

In *chapter 4* ovarian activity was studied in NC-males of both the R-strain (Amsterdam Wistar-substrain) and (R x U)<sub>F<sub>1</sub></sub> hybrid animals. The results were as follows:

1. (RU)NC-males showed 5-day cyclic ovarian activity similar to that seen in RU-females. The ovulatory quota of gonadotropin was released during the same 'critical hours' at pro-oestrus as in female rats.

2. (R)NC-males showed 5-day cycles; however, very long periods characterized by vaginal mucification and persisting corpora lutea (CL) in the ovarian grafts also occurred. By contrast normal R-females only showed 5-day cycles.
3. A greater number of follicles was transformed into CL per cycle in NC-males than in normal females. The number of follicles per 'generation' in ovarian tissue appeared to be different in male and female rats and was independent of neonatal exposure to androgens.
4. Cyclic ovarian activity in NC-males stopped after a limited number of cycles. Anovulatory NC-males showed again cyclic function in the same ovarian graft after several experimental manipulations.
5. The differences between ovarian activity in NC-males and normal females, mentioned under 2. and 4., were probably related to perinatal exposure of NC-males to testicular hormones. Under the influence of these hormones the mechanism regulating ovulation seemed to be organized in a way, which fell between that found in normal female and male rats.

In *chapter 5* regulation of luteal activity was studied in NC-males. The following results were obtained:

1. NC-males showed luteal activity under a number of experimental conditions. The duration of a luteal phase in NC-males was rather constant and about double in length of pseudopregnancy in normal female rats. This difference in length might be due to: (a) absence of uterine tissue in NC-males; (b) the grafted condition of the ovary and (c) the greater number of CL, formed per cycle in NC-males.
2. Stimuli of short duration -such as electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus or presence of ectopic pituitary tissue during the first days after ovulation- initiated a luteal phase, persisting until long after removal of the stimulus. Probably those short stimuli triggered a 'maintenance-mechanism' of luteal activity.
3. The findings under 1. and 2. indicated that luteal activity in NC-males showed similarity with luteal activity in normal females. The concept of sexual differentiation in the regulation of luteal activity suggested by Zeilmaker (1963;1964) was supported.
4. (R)NC-males showed spontaneous luteal activity after ovarian implantation in addition to 5-day cyclic ovarian activity. This

type of ovarian activity was also found in senile (R)-females. Possibly the spontaneous 'pseudopregnancy' in (R)NC-males was related to sub-optimal organization of the mechanism by which ovulation is induced, due to perinatal exposure to testicular hormones.

5. Luteal phases of normal duration could be induced in NC-males, which had become anovulatory after a period of cyclic ovarian activity. This was not possible in male rats, castrated and implanted with an ovary in adulthood (AC-males).

In *chapter 6* an attempt was made to analyse in more detail the regulation of luteal activity in AC-males and in female rats, treated neonatally with 1250 µg testosterone-propionate (TP-females). It was tried to establish whether or not TP-females would show a 'male pattern' of luteal activity. The analysis revealed:

1. CL, which were formed in ovarian grafts in AC-males after electrochemical stimulation of the preoptic area in the brain (ECS-POA), did not show functional activity. The pattern of luteolysis of these CL was similar to that of 'non-functional' CL in normal cyclic female rats. In contrast, CL formed by ECS-POA in TP-females showed a different type of luteolysis: the process seemed to be delayed for several days.
2. Luteal activity could not be induced in AC-males by electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus. In the literature (Zeilmaker et al., 1967) it had been reported that this stimulus was also ineffective in TP-females.
3. Luteal activity in AC-males, maintained by ectopic pituitary tissue, persisted during an indefinite period (17-51 days). The length of this period was strongly dependent upon the amount of ectopic pituitary tissue. Luteal activity in AC-males, maintained by ectopic pituitary tissue, stopped immediately after extirpation of the ectopic pituitary graft.

Luteal activity in TP-females, maintained by an equal amount of ectopic pituitary tissue as in AC-males, persisted during a shorter period than in AC-males (14-35 days); also no definite duration of luteal activity was observed. Luteal activity in TP-females sometimes continued for some period after extirpation of the ectopic pituitary graft.

4. The differences in luteal activity between AC-males and TP-females mentioned under 1. and 3. were probably related to (a) the sponta-

neous secretion of prolactin, known to occur in TP-females (Everett et al., 1970) and (b) the smaller number of CL, formed after ECS-POA in TP-females. It was concluded, that TP-females had, at least in principle, a 'male pattern' of luteal activity.

In *chapter 7* factors were analyzed which might contribute to cessation of cyclic ovarian activity in NC-males.

1. There might be a number of different factors by which the occurrence of cyclic ovulation in NC-males is limited. Among these factors were: exposure to cyclic ovarian activity, exposure to oestrogen and ageing. Whether or not in a given situation cyclic ovarian activity would occur (or continue) might be dependent on a poorly defined complex of factors.
2. It seemed that cyclic ovarian activity in NC-males ended with the occurrence of one anovulatory cycle in which atresia of a whole generation of follicles occurred instead of ovulation and transformation to CL.
3. It seemed difficult to establish a cause of cessation of cyclic ovarian activity in NC-males. It seemed likely that absence of ovulation in these animals was due to defective interplay between elements of the central nervous system, hypophysis and ovary, involved in ovulation. Cyclic ovarian activity was resumed after a number of experimental manipulations suggesting that, in principle, the three above elements were capable of supporting cyclic ovarian activity. It thus seemed that the causes of anovulation were different in NC-males and AC-males, with the latter animals being anovulatory because of the brain's inability to support cyclic ovarian function.

Parts of this thesis were published in *Endocrinology* : 91 (1972) 389 and 92 (1973) 674. Abstracts of papers, presented in Domburg (The Netherlands) and Copenhagen appeared in *J. Endocr.*48 (1970) lxii resp. *Acta Endocr. (Kbh)* suppl 155 (1971) 24.

## LITTERATUUR

- Adams Smith W.N. & Peng M.T. Inductive influence of testosterone upon central sexual maturation in the rat. *J. Embryol. Exp. Morph.* 17 (1967) 171-175.
- Adler N.T. Effects of the male's copulatory behavior on successful pregnancy in the female rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 69 (1969) 613-622
- Alklint T. & Norgren A. Effects of neonatally injected non-esterified testosterone on reproductive functions in female rats. *Acta Endocr. (Kbh)* 66 (1971) 720-726.
- Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *Amer. J. Anat.* 30 (1922) 297-371.
- Alloiteau J.J. Sur la nature du contrôle de la fonction lutéotrophe de l'hypophyse antérieure par l'hypothalamus chez la ratte. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 247 (1958) 1047-1049.
- Alloiteau J.J. Le contrôle hypothalamique de l'adénohypophyse III *Biol. Med.* 51 (1962) 250-259
- Alloiteau J.J. & Vignal A. Pseudogestation après injection de progestérone chez la ratte. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 246 (1958) 2804
- Altwein J.E., Lee S., Yen S.S.C. & Gittes R.F. Gonadotropic response to testicular transplants in the rat. *Endocrinology* 91 (1972) 312-316.
- Altwein J.E., Lee S., Yen S.S.C. & Gittes R.F. Gegenregulatorischer Effekt von Testis-Transplantaten auf die LH-(ICSH-)Sekretion der Hypophyse. *Der Urologe, Ausgabe A* 11 (1972) 46-50
- Anderson L.L., Bowerman A.M. & Melampy R.M. Neuro-utero-ovarian relationships. In: *Advances in Neuroendocrinology*, A.V. Nalbandov ed. - Univ. Illinois Press - Urbana (1963) 345-376.
- Arai Y. Effect of hypothalamic deafferentiation on induction of pseudo-pregnancy by vaginal-cervical stimulation in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 19 (1969) 573-575.
- Arai Y. Effect of electrochemical stimulation of the amygdala on induction of ovulation in different types of persistent estrous rats and castrated male rats with an ovarian transplant. *Endocrinol. Japon.* 18 (1971) 211-214
- Arai Y. A possible process of the secondary sterilization: delayed anovulation syndrome. *Experientia* 27 (1971) 463-464
- Arai Y. & Gorski R.A. Critical exposure time for androgenization of the rat hypothalamus determined by antiandrogen injection. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 126 (1968)a 590-593.
- Arai Y. & Gorski R.A. Protection against the neural organizing effect of exogenous androgen in the neonatal female rat. *Endocrinology* 82 (1968)b 1005-1009
- Arai Y. & Gorski R.A. Critical exposure time for androgenization of the developing hypothalamus in the female rat. *Endocrinology* 82 (1968)c 1010-1014

- Aronson L.R. & Cooper M.L. Desensitization of the glans penis and sexual behavior in cats. In: Perspectives in reproduction and sexual behavior, M. Diamond ed. - Urbana university press - (1968) 51-82
- Aschheim P. Oestrus permanent et prolactine. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 255 (1962) 3053-3056.
- Aschheim P. Résultats fournis par la greffe hétérochrone des ovaires dans l'étude de la régulation hypothalamo-hypophyso-ovarienne de la ratte sénile. *Gerontologia* 10 (1964/65) 65-75.
- Aschheim P. La régulation de la fonction endocrine de l'ovaire chez la ratte wistar sénile. *Proc. 7th Intern. Congr. Gerontology, Vienne*, 2 (1966) 105-108.
- Aschheim P. La rétroaction ovarienne dans la régulation hypothalamique de la fonction gonadotrope LH de la ratte sénile. *Coll. Nation. Centre National Rech. Sci.* 927 (1970) 363-376.
- Astwood E.B. The regulation of corpus luteum function by hypophyseal luteotrophin. *Endocrinology* 28 (1941) 309-320.
- Astwood E.B. The androgens. Ch. 70 in: The pharmacological basis of therapeutics, 3rd ed., L.S. Goodman & A. Gilman eds. McMillan - New York (1966) 1566-1578.
- Barker T.E. & Walker B.E. Initiation of irreversible differentiation in vaginal epithelium. *Anat. Rec.* 154 (1966) 149-160.
- Barracrough C.A. Production of anovulatory sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68 (1961) 62-67
- Barracrough C.A. Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. *Rec. Progr. Horm. Res.* 22 (1966) 503-539.
- Barracrough C.A. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In: Neuroendocrinology II, L. Martini & W.F. Ganong eds., Academic Press - New York. (1967) 61-99.
- Barracrough C.A. & Leatham J.H. Infertility induced in mice by a single injection of testosterone propionate. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 85 (1954) 673-674.
- Barracrough C.A. & Sawyer C.H. Induction of pseudopregnancy in the rat by reserpine and chlorpromazine. *Endocrinology* 65 (1959) 563-571
- Barracrough C.A. & Gorski R.A. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68 (1961) 68-79
- Barracrough C.A. & Fajer A.B. Progesterin secretion by gonadotropin-induced corpora lutea in ovaries of androgen sterilized rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 128 (1968) 781-785.
- Beaver D.L. The hormonal induction of a vaginal leukocytic exudate in the germ-free mouse. *Am. J. Pathol.* 37 (1960) 769-773.
- Blandau R.J., Boling J.L. & Young W.C. The length of heat in the albino rat as determined by the copulatory response. *Anat. Rec.* 79 (1941) 453-463.



- Bradbury J.T. Observations following the cessation of treatment of the infantile female rat with androgens and gonadotropic extracts. *Amer. J. Physiol.* 129 (1940) P. 315-316.
- Bradbury J.T. Permanent after-effects following masculinization of the infantile female rat. *Endocrinology* 28 (1941) 101-106.
- Bradbury J.T. & Gaensbauer F. Masculinization of the female rat by gonadotropic extracts. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 41 (1939) 128-129.
- Brooks C. McC. Studies on the neural basis of ovulation in the rabbit. *Amer. J. Physiol.* 113 (1935) 18-19.
- Browman L.G. Light and its relation to activity and estrous rhythms in the albino rat. *J. Exptl. Zool.* 75 (1937) 375-388.
- Brown-Grant K. The role of steroid hormones in the control of gonadotropin secretion in adult female mammals. *UCLA Forum Med. Sci.* 15 (1971) 269-288.
- Brown-Grant K., Exley D. & Naftolin F. Changes in oestradiol-17 $\beta$  and luteinizing hormone concentrations in peripheral plasma during the oestrus cycle of the rat. *J. Endocr.* 48 (1971) 295-296.
- Brown-Grant K. & Sherwood M.R. The 'early-androgen syndrome' in the guinea pig. *J. Endocr.* 49 (1971) 277-291.
- Brown-Grant K. & Raisman G. Reproductive function in the rat following selective destruction of afferent fibres to the hypothalamus from the limbic system. *Brain Res.* 46 (1972) 23-42
- Bruce H.M. Suckling stimulus and lactation. *Proc. Roy. Soc. B* 149 (1958) 421-423.
- Bruchowski N. & Wilson J.D. The conversion of testosterone to 5-androstan-17-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 2012-2021.
- Bunn J.P. & Everett J.W. Ovulation in persistent-estrous rats after electrical stimulation of the brain. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 96 (1957) 369-371.
- Burrows H. Leucocytic invasion as an accompaniment of epithelial metaplasia. *J. Path. Bact.* 41 (1935) 43-49.
- Butenandt A. & Hanisch G. Über Testosteron. Umwandlung des Dehydroandrostérons in Androstendiol und Testosteron; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin. *Hoppe-Seyl. Z.* 237 (1935) 89-97.
- Butler J.E.M. & Donovan B.T. The effect of surgical isolation of the hypothalamus on reproductive function in the female rat. *J. Endocr.* 49 (1971) 293-304.
- Caligaris L., Astrada J.J. & Taleisnik S. Stimulating and inhibiting effects of progesterone on the release of luteinizing hormone. *Acta Endocr. (Kbh)* 59 (1966) 177-185.
- Campbell H.J. Cyclic activity in the male hypothalamus. *Nature* 210 (1966) 1060.
- Canivenc R. & Mayer G. Les corps gestatifs sont-ils prolongés par la prolactine ? Etude de l'accouchement et de l'ablation des cornes gravides au cours de la lactation prolongée. *C. R. Soc. Biol.* 147 (1953) 2025-2027.

- Carrer H.F. & Taleisnik S. Induction and maintenance of pseudopregnancy after interruption of preoptic hypothalamic connections. *Endocrinology* 86 (1970) 231-236.
- Chatterjee A. & Harper M.J.K. Interruption of pseudopregnancy in rats by hemiovariectomy. *Endocrinology* 87 (1970) 173-175.
- Chen C.L., Amenomori Y., Lu K.H., Voogt J.L. & Meites J. Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* 6 (1970) 220-227.
- Chen C.L. & Meites J. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 86 (1970) 503-505.
- Clark H.M. A prepubertal reversal of the sex difference in the gonadotropic hormone content of the pituitary gland of the rat. *Anat. Rec.* 61 (1935)a 175-192.
- Clark H.M. A sex difference in the change in potency of the anterior hypophysis following bilateral castration in newborn rats. *Anat. Rec.* 61 (1935)b 193-202.
- Clemens J.A., Amenomori Y., Jenkins T. & Meites J. Effects of hypothalamic stimulation, hormones, and drugs on ovarian function in old female rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 132 (1969) 561-563.
- Clemens J.A. & Shaar C.J. Anterior pituitary hormone control sites in the brain. *Proc. 1st intern. congr. psychoneuroendocrinology - Karger - Basel* (1971) 356-365.
- Clemens J.A., Shaar C.J., Kleber J.W. & Tandy W.A. Areas in the brain stimulatory to LH and FSH secretion. *Endocrinology* 88 (1971) 180-184.
- Clemens L.G., Hiroi M. & Gorski R.A. Induction and facilitation of female mating behavior in rats treated neonatally with low doses of testosterone propionate. *Endocrinology* 84 (1969) 1430-1438.
- Cowan W.M., Raisman G. & Powell P.S. The connexions of the amygdala. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 28 (1965) 137-151.
- Daane T.A. & Parlow A.F. Serum FSH and LH in constant light-induced persistent estrus: short-term and long-term studies. *Endocrinology* 83 (1971) 964-968.
- David K. Über das Testosteron, das männliche Hormon aus Stierentestes. *Acta Brev. Neerl. Physiol.* 5 (1935) 85-86.
- David K. Über das Testosteron, das kristallisierte männliche Hormon aus Stierentestes. II. *Acta Brev. Neerl. Physiol.* 5 (1935) 108-109.
- David K., Dingemans E., Freud J. & Laqueur E. Über krystallinisches Hormon aus Hoden, wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. *Hoppe-Seyl. Z.* 233 (1935) 281-282.
- Dempsey E.W. & Searles H.F. Environmental modification of certain endocrine phenomena. *Endocrinology* 32 (1943) 119-128.
- Desclin L. A propos des facteurs qui déterminent la longueur de vie des corps jaunes chez le rat. *Ann. Endocr.* 19 (1958) 890-894.
- Donovan B.T. & Harris G.W. Neurohumoral mechanisms in reproduction. Ch. 27 in: *Marshall's physiology of reproduction - Longmans - London* (1966) 301-378.

- Eckstein P. & Zuckerma n S. Changes in the accessory reproductive organs in the non-pregnant female. In: Marshall's Physiology of Reproduction, Longmans - London - ch. 6 vol. I - (1965) 543-654.
- Ericsson R.J. & Baker V.F. Sexual receptivity and fertility of female rats that are in androgen induced persistent vaginal estrus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 122 (1966) 88-92.
- Evans H.M. & Simpson M.E. A comparison of anterior hypophyseal implants from normal and gonadectomized animals with reference to their capacity to stimulate the immature ovary. *Amer. J. Physiol.* 89 (1929)a 371-374.
- Evans H.M. & Simpson M.E. A sex difference in the hormone content of the anterior pituitary of the rat. *Amer. J. Physiol.* 89 (1929)b 375-378.
- Everett J.W. Spontaneous persistent estrus in a strain of albino rats. *Endocrinology* 25 (1939) 123-127.
- Everett J.W. The restoration of cyclic estrous and ovulation in persistent estrous rats by progesterone. *Anat. Rec.* 76suppl (1940) 21.
- Everett J.W. The microscopically demonstrable lipids of cyclic corpora lutea in the rat. *Amer. J. Anat.* 77 (1945) 293-323.
- Everett J.W. Hormonal factors responsible for deposition of cholesterol in the corpus luteum of the rat. *Endocrinology* 41 (1947) 364-377.
- Everett J.W. New information concerning effects on hypophyseal function induced by coital stimuli in rats. *Anat. Rec.* 112 (1952) 327.
- Everett J.W. Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophyses. *Endocrinology* 58 (1956) 786-796.
- Everett J.W. The mammalian reproductive cycle and its controlling mechanisms. In: Sex and Internal Secretions - vol. 1, W.C. Young ed. Williams & Wilkins - Baltimore (1961) 497-555.
- Everett J.W. Pseudopregnancy in the rat from brief treatment with progesterone: effect of isolation. *Nature* 198 (1963) 695-696.
- Everett J.W. Central neural control of the reproductive functions of the adenohypophysis. *Physiol. Rev.* 44 (1964) 373-431.
- Everett J.W. Provoked ovulation or long-delayed pseudopregnancy from coital stimuli in barbiturate-blocked rats. *Endocrinology* 80 (1967) 145-154.
- Everett J.W. 'Delayed pseudopregnancy' in the rat, a tool for the study of central neural mechanisms in reproduction. In: Perspectives in reproduction and sexual behavior, M. Diamond ed. - Indiana University Press (1968) 25-31.
- Everett J.W. Neuroendocrine aspects of mammalian reproduction. *Ann. Rev. Physiol.* 31 (1969) 383-416.
- Everett J.W., Sawyer C.H. & Markee J.E. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44 (1949) 234-250.
- Everett J.W. & Sawyer C.H. A 24-hour periodicity in the LH-release apparatus of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47 (1950) 198-218.

- Everett J.W. & Radford H.M. Irritative deposits from stainless steel electrodes in the preoptic rat brain causing release of pituitary gonadotropin. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 108 (1961) 604-609.
- Everett J.W. & Quinn D.L. Differential hypothalamic mechanisms inciting ovulation and pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 78 (1966) 141-150.
- Everett J.W., Holsinger J.W., Zeilmaker G.H., Redmond W.C. & Quinn D.L. Strain differences for preoptic stimulation of ovulation in cyclic, spontaneously persistent-estrous, and androgen-sterilized rats. *Neuroendocrinology* 6 (1970) 98-108.
- Feder H.H., Brown-Grant K. & Corker C.S. Pre-ovulatory progesterone, the adrenal cortex and the 'critical period' for luteinizing hormone in rats. *J. Endocr.* 50 (1971) 29-39.
- Fevold H.L., Hisaw F.L., Hellbaum A. & Hertz R. Sex hormones of the anterior lobe of the hypophysis. *Amer. J. Physiol.* 104 (1933) 710-723.
- Flerko B., Petrusz P. & Tima L. On the mechanism of sexual differentiation of the hypothalamus; factors influencing the 'critical period' of the rat. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 18 (1967) 27-36.
- Freeman M.E. & Neill J.D. The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge. *Endocrinology* 90 (1972) 1292-1294.
- Gala R.R. Studies on maintaining the lactational diestrus after early litter weaning. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 133 (1970) 164-167.
- Gans E. The FSH-content of serum of intact and gonadectomized rats and of rats treated with sex hormones. *Acta Endocr. (Kbh)* 32 (1959) 362-372
- Gans E. & de Jongh S.E. Factors determining the sex difference in pituitary and serum FSH-contents after gonadectomy. *Acta Endocr. (Kbh)* 43 (1963) 323-329.
- Gardner W.U. Sensitivity of the vagina to estrogen: genetic and transmitted differences. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 83 (1959) 145-159.
- Gardner W.U. & Allen E. Some effects of estrogen on the uterus of the mouse. *Endocrinology* 21 (1937) 727.
- Gardner W.U. & Argyris B.F. Differences in vaginal sensitivity of mice of inbred strains; localization in the vagina. *Endocrinology* 60 (1956) 532-546.
- Gibbs W.E. & Browning H.C. Epithelial changes in vaginal isografts in male mice. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 104 (1960) 631-634.
- Gittes R.F., Altwein J.E., Yen S.C. & Lee S. Testicular transplantation in the rat: long-term gonadotropin and testosterone radioimmunoassays. *Surgery* 72 (1972) 187-192.
- Goodman L. Observations on transplanted immature ovaries in the eyes of adult male and female rats. *Anat. Rec.* 59 (1934) 223-251.
- Gorski R.A. Localization and sexual differentiation of the nervous structures which regulate ovulation. *J. Reprod. Fertil.* suppl. 1 (1966) 67-88.

- Gorski R.A. Influence of age on the response to paranatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology* 82 (1968) 1001-1004.
- Gorski R.A. & Barraclough C.A. Effects of low dosages of androgen on the differentiation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. *Endocrinology* 73 (1963) 210-216.
- Grady K.L., Phoenix C.H. & Young W.C. Role of the developing rat testis in differentiation of the neural tissues mediating mating behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 59 (1965) 176-182.
- Greene R.R. & Burrill M.W. Experimental intersexuality: masculinization of female rats by post-partum treatment with anterior-pituitary-like hormones. *Proc. Soc. Exptl. Biol. (N.Y.)* 40 (1939) 514
- Greenwald G.S. Analysis of superovulation in the adult hamster. *Endocrinology* 73 (1962) 378-389
- Greer M.A. The effect of progesterone on persistent vaginal estrus produced by hypothalamic lesions in the rat. *Endocrinology* 53 (1953) 380-390.
- Groot J. de. The rat brain in stereotaxic coordinates. Noord-Hollandse Uitgeversmaatschappij - Amsterdam (1959).
- Halasz B. & Pupp L. Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinology* 77 (1965) 553-562.
- Hardy D.F. The effect of constant light on the estrous cycle and behavior of the female rat. *Physiol. Behav.* 5 (1970) 421-425.
- Harrington F.E., Eggert R.G., Wilbur R.D. & Linkenheimer W.H. Effect of coitus on chlorpromazine inhibition of ovulation in the rat. *Endocrinology* 79 (1966) 1130-1134.
- Harris G.W. Neural control of the pituitary gland. *Physiol. Rev.* 28 (1948) 139-179.
- Harris G.W. Castration of the new-born male rat and lack of sexual differentiation of the brain. *J. Physiol. (London)* 169 (1963) 117-118P.
- Harris G.W. Female cycles of gonadotrophic secretion and female sexual behaviour in adult male rats castrated at birth. *J. Physiol.* 175 (1964)a 75-76P.
- Harris G.W. Sex hormones, brain development and brain function. *Endocrinology* 75 (1964)b 627-648.
- Harris G.W. & Jacobsohn D. Functional grafts of the anterior pituitary gland. *Proc. Roy. Soc. London B* 139 (1952) 263-276.
- Heimer L. & Nauta W.J.H. The hypothalamic distribution of the stria terminalis in the rat. *Brain Res.* 13 (1969) 284-297.
- Henzl M.R., Chang C.G., Sundaran K. & Kincl F.A. The influence of neonatal castration and neonatally administered steroids on the development of transplanted ovarian tissue under the kidney capsule in male rats and hamsters. *Acta Endocr. (Kbh)* 66 (1971) 547-557.
- Hill R.T. Oestrous reactions in female rats united with castrate parabionts. *Endocrinology* 17 (1933) 414-420.
- Hillarp N-A., Olivecrona H. & Silfverskiöld. Evidence for participation of the preoptic area in male mating behaviour. *Experientia* 10 (1954) 224-225.

- Jacobsohn D. & Norgren A. Early effects of testosterone propionate injected into 5 day old rats. *Acta Endocr. (Kbh)* 49 (1965) 453-465.
- Johnson D.C. Serum follicle-stimulating hormone (FSH) in normal and androgenized male and female rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 138 (1971) 140-144.
- Johnson D.C. Sexual differentiation of gonadotropin patterns. *Amer. Zoologist* 12 (1972) 193-205.
- Jost A. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 259 (1970) 119-130.
- Kaasjager W.A. Progesteron en hypothalamische regulatie van ovulatie bij de rat. *Acadernisch Proefschrift Leiden* (1970).
- Kalra S.P. & Sawyer C.H. Blockade of copulation-induced ovulation in the rat by anterior hypothalamic deafferentiation. *Endocrinology* 87 (1970) 1124-1128.
- Kalra S.P., Ajika K., Krulich L., Fawcett C.P., Quijada M. & McCann S.M. Effects of hypothalamic and preoptic electrochemical stimulation on gonadotropin and prolactin release in proestrous rats. *Endocrinology* 88 (1971) 1150-1158.
- Kawashima S. Influence of continued injections of sex steroids on the estrous cycle in the adult rat. *Ann. Zool. Jap.* 33 (1960) 226-233.
- Kawashima S. Inhibitory action of reserpine on the development of the male pattern of gonadotropin secretion in the rat. *Ann. Zool. Jap.* 37 (1964) 79-85.
- Kikuyama S. & Kawashima S. Formation of corpora lutea in ovarian grafts in ovariectomized adult rats subjected to early postnatal treatment with androgen. *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo* 16 (1966) 69-74.
- Kincl F.A., Pi F.A., Maqueo M., Lasso L.H., Oriol A. & Dorfman R.I. Inhibition of sexual development in male and female rats treated with various steroids at the age of five days. *Acta Endocr. (Kbh)* 49 (1965) 193-206.
- Kincl F.A. & Maqueo M. Prevention by progesterone of steroid-induced sterility in neonatal male and female rats. *Endocrinology* 77 (1965) 859-862.
- Kollar E.J. Reproduction in the female rat after pelvic nerve neurectomy. *Anat. Rec.* 115 (1953) 641-658.
- Köves K. & Halasz B. Location of the neural structures triggering ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 6 (1970) 180-193.
- Kuehn R.E. & Beach F.A. Quantitative measurements of sexual receptivity in female rats. *Behavior* 21 (1963) 282-298.
- Labhsetwar A.P. Age-dependent changes in the pituitary-gonadal relationship: a study of ovarian compensatory hypertrophy. *J. Endocr.* 39 (1967) 387-393.
- Labhsetwar A.P. Estimation of the minimum amount of luteinizing hormone secreted for ovulation in rats. *J. Endocr.* 46 (1970) 551-552.

- Ladosky W., Noronha J.G.L. & Gaziri I.F. Luteinization of ovarian grafts in rats related to treatment with testosterone in the neonatal period. *J. Endocr.* 43 (1969) 253-258.
- Lawton I.E. & Schwartz N.B. Pituitary-ovarian function in rats exposed to constant light: a chronological study. *Endocrinology* 81 (1967) 497-508.
- Lee S. Experience with organ transplantation in the rat. *J. Res. Inst. Med. Sci., Korea* 3 (1971) 43-60.
- Lee S., Tung K.S.K. & Orloff M.J. Testicular transplantation in the rat. *Transpl. Proc.* 3 (1971) 586-590.
- Levine S. & Mullins R.F. Sexual differentiation and behavior. *Proc. 2nd Int. Congr. Horm. Ster. - Exc. Med.* (1967) 925-931.
- Lipschütz A. New developments in ovarian dynamics and the law of follicular constancy. *J. Exp. Biol.* 5 (1928) 283-291.
- Long J.A. & Evans H.M. The estrous cycle of the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.* 5 (1922) 5-148.
- Luttge W.G. & Whalen R.E. Dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone: comparative effectiveness in masculinizing and defeminizing reproductive systems in male and female rats. *Hormones and behavior* 1 (1970) 265-281.
- McDonald P.G. Some biological actions of dihydrotestosterone. *J. Reprod. Fert.* 25 (1971) 309-310.
- McDonald P.G. & Doughty C. Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. *J. Reprod. Fert.* 30 (1972) 55-62.
- McDonald P.G. & Doughty C. Inhibition of androgen-sterilization in the female rat by administration of an antioestrogen. *J. Endocr.* 55 (1972) 455-456.
- Machida T. Luteinization of ovarian transplants in gonadectomized male and female rats under stressful conditions and its relation to sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinol. Japon.* 17 (1970) 189-193.
- Malven P.V. & Francis R.P. Structural luteolysis of induced corpora lutea in 'androgen-sterilized' rats. *Anat. Rec.* 165 (1969) 55-60.
- Mandl A.M. Cyclical changes in the vaginal smears of senile nulliparous and multiparous rats. *J. Endocr.* 22 (1961) 257-268.
- Martins T. Greffes de vagin sur des rats males, et observation des cycles au moyen des frottes. *C. R. Soc. Biol.* 109 (1932) 134-135.
- Moll J. & Zeilmaker G.H. Induction of ovulation by hypothalamic stimulation in castrated male rats bearing ovarian transplants. *Acta Endocr. (kbh) suppl.* 100 (1965) 146.
- Moll J. & Zeilmaker G.H. Ovulatory discharge of gonadotrophins induced by hypothalamic stimulation in castrated male rats bearing a transplanted ovary. *Acta Endocr. (Kbh)* 51 (1966) 281-289.
- Moore C.R. & Price D. Gonad hormone functions, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism. *Amer. J. Anat.* 50 (1932) 13-71.

- Neill J.D. Sexual differentiation in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* 90 (1972) 1154-1159.
- Nequin L.G. & Schwartz N.B. Adrenal participation in the timing of mating and LH release in the cyclic rat. *Endocrinology* 88 (1971) 325-331.
- Neumann F., Berswordt-Wallrabe R. von, Eiger W., Steinbeck H., Hahn J.D. & Kramer M. Aspects of androgen-dependent events as studied by antiandrogens. *Rec. Progr. Horm. Res.* 26 (1970)a 337-410.
- Neumann F., Steinbeck H. & Hahn J.D. Hormones and brain differentiation. in: The hypothalamus, L. Martini, M. Motta & F. Fraschini eds. *Ac. Pr. - New York* (1970)b 569-603.
- Niemi M. & Ikonen M. Histochemistry of the Leydig cells in the postnatal prepubertal testis of the rat. *Endocrinology* 72 (1963) 443-448.
- Noumura T., Weisz J. & Lloyd C.W. In vitro conversion of 7-<sup>3</sup>H-progesterone to androgens by the testis during the second half of fetal life. *Endocrinology* 78 (1966) 245-253.
- Parkes A.S. Increasing the effectiveness of testosterone. *The Lancet* (1936) 674-676.
- Parkes A.S. & Deanesley R. The ovarian hormones. In: Marshall's Physiology of Reproduction ch. 30 - Longmans - London (1966) 570-828.
- Peters H. & Sørensen I.N. Fertility and mating behaviour of androgenized mice. *J. Endocr.* 51 (1971) 589-594.
- Pfeiffer C.A. Functional capacities of ovaries of new-born rats after transplantation into ovariectomized adult rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. (N.Y.)* 31 (1934) 479-481.
- Pfeiffer C.A. Origin of functional differences between male and female hypophyses. *Proc. Soc. Exptl. Biol. (N.Y.)* 32 (1935) 603-605.
- Pfeiffer C.A. Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads. *Amer. J. Anat.* 58 (1936) 195-225.
- Phoenix C.H., Goy R.W. & Resko J.A. Psychosexual differentiation as a function of androgenic stimulation. In: Perspectives in Reproduction and Sexual Behavior, M. Diamond ed. - Indiana Univ. Pr. (1968) 33-49.
- Quilligan E.J. & Rothchild I. The corpus luteum-pituitary relationship: the luteotrophic activity of homotransplanted pituitaries in intact rats. *Endocrinology* 67 (1960) 48-53.
- Quinn D.L. Luteinizing hormone release following preoptic stimulation in the male rat. *Nature* 209 (1966) 891-892.
- Quinn D.L. & Everett J.W. Delayed pseudopregnancy induced by selective hypothalamic stimulation. *Endocrinology* 80 (1967) 155-162.
- Raisman G. & Field P.M. Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. *Science* 173 (1971) 731-733.
- Raisman G. & Field P.M. Functional implications of a quantitative ultrastructural analysis of synapses in the preoptic area and ventromedial nucleus. In: The Biology of the Amygdala, B.E. Eleutheriou ed. Plenum Press - New York (1972) 83-94.



- Resko J.A., Feder H.H. & Goy R.W. Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats. *J. Endocr.* 40 (1968) 485-491.
- Richter C.P. Hormones and rhythms in man and animals. *Rec. Progr. Horm. Res.* 13 (1957) 105-159.
- Rodgers C.H. Influence of copulation on ovulation in the cycling rat. *Endocrinology* 88 (1971) 433-436.
- Rothchild I. The corpus luteum-pituitary relationship; the association between the cause of luteotrophin secretion and the cause of follicular quiescence during lactation; the basis for a tentative theory of the corpus luteum-pituitary relationship in the rat. *Endocrinology* 67 (1960) 9-41.
- Rothchild I. The corpus luteum-hypophysis relationship. *Acta Endocr. (Kbh)* 49 (1965) 107-119.
- Rothchild I. & Schubert R. Corpus luteum-pituitary relationship: induction of pseudopregnancy in the rat by progesterone. *Endocrinology* 73 (1963) 969-972.
- Roy F.P. van & Rees G.P. van. Sex difference in the FSH-content of the serum in intact rats. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. Series C* 64 (1961) 114-117.
- Schindler W.J. & Wagner J.W. Pituitary-thyroid function in adult rats subsequent to neonatal gonadectomy and gonadal transplants. *Neuroendocrinology* 5 (1969) 350-367.
- Schulling G.A. Progesteron en de regulatie van de ovariële cyclus van de rat. *Academisch Proefschrift Leiden* (1972).
- Schwartz N.B. A model for the regulation of ovulation in the rat. *Rec. Progr. Horm. Res.* 25 (1969) 1-55.
- Schwartz N.B. & McCormack C.E. Reproduction: gonadal function and its regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 34 (1972) 425-472.
- Segal S.J. & Johnson D.C. Inductive influence of steroid hormones on the neural system: ovulation controlling mechanisms. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 48 (1959) 261-273.
- Shelesnyak M.C. Induction of pseudopregnancy in the rat by means of electrical stimulation. *Anat. Rec.* 49 (1931) 179-183.
- Singh K.B. Induction of polycystic ovarian disease in rats by continuous light. *Am. J. Obst. Gynec.* 104 (1969) 1004-1007.
- Smelser G.K. The response of guinea pig mammary glands to sex hormones and ovarian grafts and its bearing on the problem of sex hormone antagonism. *Physiol. Zool.* 6 (1933) 396-449.
- Spies H.G., Forbes Y.M. & Clegg M.T. The influence of coitus, suckling and prolactin injections on pregnancy in pelvic neurectomized rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 138 (1971) 470-474.
- Spies H.G. & Niswender G.D. Levels of prolactin, FSH and LH in the serum of intact and pelvic-neurectomized rats. *Endocrinology* 88 (1971) 937-943.
- Stern E., Mickey M.R. & Osvaldo L. Lactogenesis in the androgen-sterile rat: augmentation following 7,12dimethylbenzanthracene. *Nature* 206 (1965) 369-371.

- Stockard C.R. & Papanicolaou G.N. The existence of a typical oestrous cycle in the guinea-pig - with a study of its histological and physiological changes. *Amer. J. Anat.* 22 (1917) 225-283.
- Sutherland S.D. & Gorski R.A. An evaluation of the inhibition of androgenization of the neonatal female rat brain by barbiturate. *Neuroendocrinology* 10 (1972) 94-108.
- Swanson H.E. Modifications of the reproductive tracts of hamsters of both sexes by neonatal administration of androgen or oestrogen. *J. Endocr.* 36 (1966) 327-328.
- Swanson H.E. Effect of castration at birth in hamsters of both sexes on luteinization of ovarian implants, oestrous cycles and sexual behaviour. *J. Reprod. Fert.* 21 (1970) 183-186.
- Swanson H.E. & Werff ten Bosch J.J. van der. The 'early-androgen' syndrome: its development and the response to hemispaying. *Acta Endocr. (Kbh)* 45 (1964)a 1-12.
- Swanson H.E. & Werff ten Bosch J.J. van der. The 'early-androgen' syndrome: differences in response to prenatal and postnatal administration of various doses of testosterone propionate in female and male rats. *Acta Endocr. (Kbh)* 47 (1964)b 37-50.
- Swanson H.E. & Werff ten Bosch J.J. van der. The 'early-androgen' syndrome: effects of prenatal testosterone propionate. *Acta Endocr. (Kbh)* 50 (1965) 379-390.
- Takahashi M. & Suzuki Y. The effect of uterine cervical stimulation at postpartum estrus upon the post-weaning fate of the lactational corpora lutea. *Endocrinol. Japon.* 18 (1971) 5-12.
- Takasugi N. Einflüsse von Androgen und Progesteron auf die Ovarien der Ratten, denen sofort nach der Geburt Oestrogeninjektion durchgeführt wurde. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo IV* 7 (1954) 299-311.
- Takasugi N., Bern H.A. & DeOme K.B. Persistent vaginal cornification in mice. *Science* 138 (1962) 438-439.
- Taleisnik S., Caligaris L. & Astrada J.J. Sex differences in the release of luteinizing hormone evoked by progesterone. *J. Endocr.* 44 (1969) 313-321.
- Taleisnik S., Caligaris L. & Astrada J.J. Sex difference in hypothalamo-hypophysial function. *UCLA Forum Med. Sci.* 15 (1971) 171-184.
- Terasawa E., Kawakami M. & Sawyer C.H. Induction of ovulation by electrochemical stimulation in androgenized and spontaneously constant-estrous rats. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 132 (1969) 497-501.
- Treloar O.L., Wolf R.C. & Meyer R.K. Failure of a single neonatal dose of testosterone to alter ovarian function in the rhesus monkey. *Endocrinology* 90 (1972) 281-284.
- Tsafriri A. & Kraicer P.F. The time sequence of ovum maturation in the rat. *J. Reprod. Fert.* 29 (1972) 387-393.

- Uchida K., Kadowaki M. & Miyake T. Ovarian secretion of progesterone and 20-hydroxypregn-4-en-3-one during the rat estrous cycle in chronological relation to pituitary release of luteinizing hormone. *Endocrinol. Japon.* 16 (1969) 227-237.
- Uilenbroek J.Th.J. & Werff ten Bosch J.J. van der. Ovulation induced by pregnant mare serum gonadotropin in the immature rat treated neonatally with a low or a high dose of androgen. *J. Endocr.* 55 (1972) 533-541.
- Velasco M.E. & Taleisnik S. Release of gonadotropins induced by amygdaloid stimulation in the rat. *Endocrinology* 84 (1969) 132-139.
- Vermeiden J.P.W. & Zeilmaker G.H. Relation between maturation division and ovulation induced by gonadotropic stimulation in pro-oestrous female rats. *J. Endocr.* *in press*.
- Weinstein L., Gardner W.U. & Allen E. Bacteriology of the uterus with special reference to oestrogenic hormones and the problems of pyometra. *Proc. Soc. Exptl. Biol. (N.Y.)* 37 (1937) 391-393.
- Welschen R. Corpora lutea atretica in ovarian grafts. *J. Endocr.* 49 (1971) 693-694.
- Welschen R. Regulation of the number of follicles maturing and ovulating during the 5-day cycle in the rat. *Academisch Proefschrift Rotterdam* (1972).
- Weniger J.P., Ehrhardt J.D. & Fritig B. Sécrétion de testostérone et d'androstènedione par les testicules embryonnaires de souris cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 264 (1967) 1069-1071.
- Weniger J.P. & Zeis A. Transformation de la testostérone en dihydrotestostérone par les canaux de Wolff de l'embryon de souris. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 271 (1970) 1307-1310.
- Werff ten Bosch J.J. van der, Tuinebreijer W.E. & Vreeburg J.Th.M. The incomplete or delayed early-androgen syndrome. In: *Hormones in Development*, M. Hamburg ed. - Appleton - New York (1971) 669-675.
- Wildschut J. Oestradiol en de ovulatie bij de rat. *Academisch Proefschrift Leiden* (1972).
- Wilson J.G., Hamilton J.B. & Young Y.C. Influence of age and presence of the ovaries on reproductive function in rats injected with androgens. *Endocrinology* 29 (1941) 784-789.
- Wolfe J.M., Burack E. & Wright A.W. The estrous cycle and associated phenomena in a strain of rats characterized by a high incidence of mammary tumors together with observations on the effects of advancing age on these phenomena. *Am. J. Cancer* 38 (1940) 383-398.
- Yazaki I. Effects of adrenalectomy, injection of hormonal steroids or gonadotropins, and subjection to stressful stimuli on subcutaneous ovarian grafts in castrated male rats, as studied by daily examination of vaginal smears. *Jap. J. Zool.* 12 (1959) 267-277.
- Yazaki I. Further studies on endocrine activity of subcutaneous ovarian grafts in male rats by daily examination of smears from vaginal grafts. *Ann. Zool. Jap.* 33 (1960) 217-225.

- Zarrow M.X. & Clark J.H. Ovulation following vaginal stimulation in a spontaneous ovulator and its implications. *J. Endocr.* 40 (1968) 343-352.
- Zarrow M.X., Johnson N.P., Denenburg V.H. & Bryant L.P. Maintenance of lactational diestrus in the postpartum rat through tactile stimulation in the absence of suckling. *Neuroendocrinology* 11 (1973) 150-155.
- Zeilmaker G.H. Luteotrophic hormone secretion in the male rat. *Acta Endocr. (Kbh) suppl.* 67 (1962) 70.
- Zeilmaker G.H. Experimental studies on the regulation of corpus luteum function in castrated male rats bearing a transplanted ovary. *Acta Endocr. (Kbh)* 43 (1963)a 246-254.
- Zeilmaker G.H. Corpus luteum function in female rats bearing isotransplanted pituitary tissue (preliminary observations). *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 12 (1963)b 325.
- Zeilmaker G.H. Aspects of the regulation of corpus luteum function in androgen-sterilized female rats. *Acta Endocr. (Kbh)* 46 (1964) 571-579.
- Zeilmaker G.H. Normal and delayed pseudopregnancy in the rat. *Acta Endocr. (Kbh)* 49 (1965) 558-566.
- Zeilmaker G.H. The biphasic effect of progesterone on ovulation in the rat. *Acta Endocr. (Kbh)* 51 (1966) 461-468.
- Zeilmaker G.H. Effects of prolonged feeding of an ovulation inhibitor (Lyndiol) on ageing of the hypothalamic-ovarian axis and pituitary gland tumorigenesis in rats. *J. Endocr.* 43 (1969) xxi-xxii.
- Zeilmaker G.H. & Carlsen R.A. Experimental studies on the effect of ergo-cornine methanesulphonate on the luteotrophic function of the rat pituitary gland. *Acta Endocr. (Kbh)* 41 (1962) 321-335.
- Zeilmaker G.H., Everett J.W., Redmond W.C. & Quinn D.L. Defective control of prolactin secretion in androgen-sterilized (TP) female rats. *Acta Endocr. (Kbh) suppl.* 100 (1967) 109.
- Zimbelman R.G. opmerkingen in de discussie bij: Gorski R.A. (1966).

## CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 26 maart 1944 in Tilburg geboren; in deze stad werd de lagere school doorlopen. De middelbare school-opleiding werd gevolgd aan het St. Dominicuscollege te Nijmegen; daar werd in 1961 het diploma gymnasium-8 behaald.

In 1961 werd de studie aangevangen aan de Rijksuniversiteit te Utrecht; in 1964 werd het kandidaatsexamen biologie behaald. Voor het doctoraal examen werd werk verricht aan het Fysisch Laboratorium (Prof. Dr. J.A. Smit) en het Laboratorium voor Vergelijkende Fysiologie (Prof. Dr. S. Dijkgraaf) te Utrecht, aan het ITBON (Dr. A.D. Voûte) te Arnhem en het Nederlands Centraal Instituut voor Hersenonderzoek (Dr. J.P. Schadé) te Amsterdam. Het doctoraal examen werd -met de zog. onderwijsaantekening- in 1967 behaald.

Gedurende de studietijd werd onderwijservaring opgedaan tijdens student-assistentschappen (zoölogie, 2 jaar; histologie voor tandheelkundige studenten, 1 jaar) en als parttime leerkracht bij het middelbaar onderwijs (Twickel-college te Hengelo, 2 jaar; Montfort-college te Rotterdam, 1 jaar).

Vanaf 1967 is de schrijver werkzaam op de afdeling voor Endocrinologie, groei en voortplanting van de toenmalige Medische Faculteit Rotterdam. Na aanvankelijk vooral werkzaam te zijn geweest met de voorbereiding en inrichting van een practicum endocrinologie voor tweedejaars medische studenten werd in 1969 het onderhavige werk onder leiding van Dr. G.H. Zeilmaker begonnen.

- - - - -



# INHOUD

## VOORWOORD

## LIJST VAN AFKORTINGEN

HOOFDSTUK 1 : ALGEMENE INLEIDING	1 - 20
<i>Geslachtsverschillen in regulatie van gonade-activiteit bij de rat . . . . .</i>	1
<i>Aspecten van de geslachtsverschillende ontwikkeling van het ovulatiemechanisme van de rat . . . . .</i>	6
HOOFDSTUK 2 : MOTIVERING VAN HET EIGEN ONDERZOEK	21 - 23
HOOFDSTUK 3 : GETRANSPLANTEERD VAGINAWEEFSEL ALS INDICATOR VAN OVARIUMACTIVITEIT	24 - 35
INLEIDING . . . . .	24
MATERIAAL EN METHODEN . . . . .	28
<i>Transplantatie van vaginaweefsel onder de abdominale huid . . . . .</i>	28
<i>Transplantatie van vaginaweefsel onder het nierkapsel . . . . .</i>	28
RESULTATEN . . . . .	29
<i>exp.1 Dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten onder de abdominale huid . . . . .</i>	29
<i>exp.2 Microscopisch onderzoek van onder het nierkapsel getransplanteerd vagina-epitheel . . . . .</i>	29
DISCUSSIE . . . . .	33
§ 1 <i>Dagelijkse uitstrijken van vaginatransplantaten onder de abdominale huid . . . . .</i>	33
§ 2 <i>Microscopisch onderzoek van onder het nierkapsel getransplanteerd vagina-epitheel . . . . .</i>	34
SAMENVATTING . . . . .	35
HOOFDSTUK 4 : CYCLISCHE OVARIUMACTIVITEIT IN NC-3 $\delta$	36 - 71
INLEIDING . . . . .	36
MATERIAAL EN METHODEN . . . . .	39
<i>Proefdieren . . . . .</i>	39
<i>Neonatale castratie . . . . .</i>	40
<i>Vagina- en ovariumtransplantatie . . . . .</i>	40
<i>Microscopisch onderzoek . . . . .</i>	41
<i>Kwantificering van vrouwelijke bronstgedrag . . . . .</i>	41
<i>ECS-POA en ECS-AME . . . . .</i>	41

RESULTATEN	42
exp.1 <i>Dagelijkse vagina-uitstrijken van (RU)NC-33</i>	42
exp.2 <i>Dagelijkse vagina-uitstrijken van (R)NC-33</i>	43
exp.3 <i>Correlatie van vagina-uitstrijken en ovariummorfologie</i>	44
exp.4 <i>Het aantal follikels, dat per cyclus ovuleert</i>	49
exp.5 <i>Een 'kritische periode' voor de afgifte van de ovulatoire hoeveelheid gonadotropine</i>	51
exp.6 <i>Observaties van vrouwelijk bronstgedrag van cyclische NC-33</i>	54
exp.7 <i>Ovariumactiviteit in NC-33 op verschillende tijdstippen na ovariumtransplantatie</i>	59
exp.8 <i>Inductie van CL-vorming in anovulatoir geworden NC-33</i>	59
exp.9 <i>Observaties van vrouwelijk bronstgedrag van anovulatoire NC-33</i>	61
DISCUSSIE	62
§ 1 <i>Cyclische ovariumactiviteit in NC-33</i>	62
§ 2 <i>Een grotere 'generatie' follikels in ovariumtransplantaten in NC-33</i>	64
§ 3 <i>Een 'kritische periode' bij NC-33 op pro-oestrus</i>	65
§ 4 <i>Vroegtijdig ophouden van cyclische ovariumactiviteit in NC-33</i>	67
§ 5 <i>Cyclische ovariumactiviteit in anovulatoir geworden NC-33</i>	68
SAMENVATTING	70
HOOFDSTUK 5 : REGULATIE VAN LUTEALE ACTIVITEIT IN NC-33	71 - 90
INLEIDING	71
MATERIAAL EN METHODEN	73
<i>Ectopische implantatie van hypofyseweefsel en verwijderen van een ectopisch hypofysetransplantaat</i>	73
<i>Elektrische stimulatie van de ventromediale hypothalamus</i>	74
<i>Criteria voor luteale activiteit</i>	75
<i>Duur van een fase met luteale activiteit</i>	76
RESULTATEN	76
exp.1 <i>Spontane luteale activiteit in (R)NC-33</i>	76
exp.2 <i>Luteale activiteit in NC-33 na ectopische implantatie van hypofyseweefsel</i>	78
exp.3 <i>'Copulatiestimulus' en luteale activiteit in NC-33</i>	81



<i>exp.4</i>	<i>Effect van ES-VMN op de oestrusdag op ovariumactiviteit in NC-♂♂</i>	81
<i>exp.5</i>	<i>Luteale activiteit in anovulatoir geworden NC-♂♂</i>	82
DISCUSSIE		82
§ 1	<i>Een 'vrouwelijk type' regulatie van luteale activiteit in NC-♂♂ ?</i>	82
§ 2	<i>Initiatie en onderhoud van luteale activiteit</i>	86
§ 3	<i>Spontane luteale activiteit in (R)NC-♂♂</i>	87
§ 4	<i>Luteale activiteit in anovulatoir geworden NC-♂♂</i>	89
SAMENVATTING		90
HOOFDSTUK 6 : REGULATIE VAN LUTEALE ACTIVITEIT IN AC-♂♂ EN TP-♀♀		91 - 109
INLEIDING		91
MATERIAAL EN METHODEN		92
RESULTATEN		92
<i>exp.1</i>	<i>Activiteit van door ECS-POA geïnduceerde CL</i>	92
<i>exp.2</i>	<i>Luteale activiteit onder invloed van ectopisch hypofyseweefsel</i>	96
<i>exp.3</i>	<i>Effect van het verwijderen van ectopisch hypofyseweefsel op luteale activiteit</i>	99
<i>exp.4</i>	<i>Effect van ES-VMN in AC-♂♂</i>	101
DISCUSSIE		103
§ 1	<i>Nadere definiëring van het 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit</i>	103
§ 2	<i>Relatie tussen neonatale differentiatie van het ovulatiemechanisme en van mechanismen van regulatie van luteale activiteit</i>	106
§ 3	<i>Een 'mannelijk type' regulatie van luteale activiteit in TP-♀♀</i>	108
SAMENVATTING		108
HOOFDSTUK 7 : VERGELIJKING VAN HET OVULATIEMECHANISME VAN AC-♂♂ MET DAT VAN ANOVULATOIR GEWORDEN NC-♂♂		110 - 126
INLEIDING		110
MATERIAAL EN METHODEN		112
RESULTATEN		113
<i>exp.1</i>	<i>De duur van de periode met cyclische ovariumactiviteit in NC-♂♂ met twee verschillende typen van ovariumactiviteit</i>	113
<i>exp.2</i>	<i>Ovariummorfologie van NC-♂♂ in relatie met de overgang van cyclische ovariumactiviteit naar anovulatie</i>	116
<i>exp.3</i>	<i>Cyclische ovariumactiviteit na ovarium-implantatie op verschillende leeftijden</i>	117

<i>exp. 4</i>	<i>Cyclische ovariumactiviteit na langdurige voorbehandeling met OB . . . . .</i>	<i>119</i>
<i>exp. 5</i>	<i>Vergelijking van het ovulatiemechanisme van AC-<math>\delta\delta</math> met dat van anovulatoir geworden NC-<math>\delta\delta</math> . . . . .</i>	<i>120</i>
DISCUSSIE	. . . . .	120
§ 1	<i>Aard en mogelijke lokalisatie van de limiterende factoren van cyclische ovariumactiviteit in NC-<math>\delta\delta</math> . . . . .</i>	<i>120</i>
§ 2	<i>Mogelijke loop van gebeurtenissen bij het ophouden van cyclische ovariumactiviteit in NC-<math>\delta\delta</math> . . . . .</i>	<i>124</i>
§ 3	<i>Vergelijking van het ovulatiemechanisme van AC-<math>\delta\delta</math> en anovulatoire NC-<math>\delta\delta</math> . . . . .</i>	<i>125</i>
SAMENVATTING	. . . . .	126
SUMMARY	. . . . .	127 - 130
LITTERATUUR	. . . . .	131 - 144
CURRICULUM VITAE	. . . . .	145